

Identifikation und Charakterisierung von Interaktionspartnern des Proteins Polyduktin

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.) der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Annemarie de Jel
geboren in Rotterdam

Bonn, Dezember 2008

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.

Erscheinungsjahr: 2009

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pathologie an der Universitätsklinik Bonn angefertigt.

1. Referent: Prof. Dr. R. Büttner
2. Referent: Prof. Dr. D. Fürst

Tag der Promotionsprüfung: 03.April 2009

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erklärung zur Urheberschaft

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Wörtlich oder indirekt übernommenes Gedankengut wurde als solches kenntlich gemacht. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht wurde.

Annemarie de Jel

Bonn, Dezember 2008

Für meinen Bruder

Inhaltsverzeichnis

Erklärung zur Urheberschaft	III
Inhaltsverzeichnis	V
Zusammenfassung	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
I. Einleitung	1
1. Die Entwicklung der Niere	1
2. Polyzystische Nierenerkrankungen	6
2.1 Nephronophthie	7
2.2 Medulläre zystische Nierenerkrankungen	10
2.3 Glomerulozystische Nierenerkrankung	11
2.4 Autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung	12
2.4.1 ADPKD Typ I	12
2.4.2 ADPKD Typ II	14
2.5 Autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung	15
2.5.1 Das ARPKD-Gen: PKHD1	16
2.5.2 Expression des PKHD1-Gens	17
2.5.3 Polyduktin	18
2.5.4 Tiermodelle	22
3. Zielsetzung	24
II. Material und Methoden	25
1. Material	25
1.1 Chemikalien	25
1.2 Verbrauchsmaterialien	28
1.3 Kits	29
1.4 DNS-Größenstandards und Protein-Molekulargewichtsstandard	29
1.5 Radiochemikalien	29
1.6 Plasmide	30
1.7 Verwendete Organismen und cDNS-Bibliothek	32
1.7.1 <i>E. coli</i> -Stämme	32
1.7.2 <i>S. cerevisiae</i> -Stamm	33
1.7.3 cDNS-Bibliothek	33
1.8 Enzyme	33
1.9 Oligonukleotide	34
1.9.1 Oligonukleotide zur Klonierung des C-Terminus von Polyduktin	34
1.9.2 Oligonukleotide zur Amplifizierung von cDNS-Fragmenten aus der Bibliothek	34
1.9.3 Oligonukleotide zur Klonierung der OFD1-Mutanten und der voll-ständigen cDNS	34
1.9.4 Oligonukleotide zur Klonierung der NPR1-Mutanten	34
1.9.5 Oligonukleotide zur Klonierung der C7-Mutante und der vollständigen	35
1.9.6 Oligonukleotide zur Klonierung der Uromodulin-Mutanten und der voll-ständigen cDNS	35
1.9.7 Oligonukleotide zur Einführung von Restriktionsstellen und des Myc-Epitops	35
1.9.8 Oligonukleotide zur Sequenzierung	36
1.10 Antikörper	37
1.10.1 Primäre Antikörper	37
1.10.2 Sekundäre Antikörper	37
1.11 Geräte	38

1.12	Lösungen, Medien und Puffer	40
1.12.1	Bakterienmedien und Lösungen	40
1.12.2	Hefemedien und Lösungen	40
1.12.3	Lösungen zur Isolierung, Reinigung und Analyse von DNS	41
1.12.4	SDS-Page und Immunoblotting	42
1.12.5	GST-Proteininteraktionsstudien	42
1.12.6	Lösungen für die Immunohistologie	42
2.	Methoden	44
2.1	Molekularbiologische Methoden	44
2.1.1	Herstellung und Transformation kompetenter Zellen	44
2.1.1.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	44
2.1.1.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	44
2.1.1.3	Herstellung kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	45
2.1.1.4	Transformation kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	45
2.1.2	Isolierung, Reinigung und Detektion von Nukleinsäuren	46
2.1.2.1	Isolierung von Plasmid-DNS im analytischen Maßstab aus <i>E. coli</i>	46
2.1.2.2	Isolierung von Plasmid-DNS im präparativem Maßstab aus <i>E. coli</i>	47
2.1.2.3	Isolierung von Plasmid-DNS im analytischen Maßstab aus <i>S. cerevisiae</i>	47
2.1.2.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	48
2.1.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	48
2.1.2.6	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	49
2.1.2.7	Phenol-/Chloroform-Extraktion von DNS-Lösungen	49
2.1.2.8	Ethanol-Präzipitation von DNS-Lösungen	49
2.1.2.9	PEG-Präzipitation von Polymerase-Kettenreaktion-Produkten	50
2.1.3	Enzymreaktionen mit DNS	50
2.1.3.1	Restriktion der DNS mit Restriktionsendonukleasen	50
2.1.3.2	Dephosphorylierung von 5'-DNS-Überhängen	50
2.1.3.3	Ligation von DNS-Fragmenten	51
2.1.3.4	Klonierung von PCR-Produkten	51
2.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	52
2.1.4.1	PCR zur Amplifikation des C-Terminus von Polyduktin	52
2.1.4.2	Amplifikation von cDNS-Fragmenten direkt aus dem Hefeklon	53
2.1.4.3	PCR zur Amplifikation der OFD1-cDNS	53
2.1.4.4	PCR zur Amplifikation der NPR1-cDNS	54
2.1.4.5	PCR zur Amplifikation der C7-cDNS	55
2.1.4.6	PCR zur Amplifikation der UMOD-cDNS	55
2.1.5	Sequenzierung von DNS	56
2.2	Hefe-zwei-Hybrid-Methoden	57
2.2.1	Amplifizierung und Reinigung der cDNS-Bibliothek	57
2.2.2	ONPG-Test	58
2.2.3	β -Galactosidase-Filter-Test	59
2.3	Proteinchemische Methoden	60
2.3.1	<i>In vitro</i> -Translation von Proteinen	60
2.3.2	Proteinextraktion aus Hefezellen	60
2.3.3	Expression und Extraktion von GST-Proteinen	61
2.3.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	61
2.3.5	Kopplung von GST-Proteinen an Sepharose	62
2.3.6	Proteininteraktionsstudien	62
2.3.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	63
2.3.8	Western Blot und Immundetektion	63
2.3.9	Coomassiefärbung von Proteinen	64
2.4	Histologische und immunohistologische Methoden	64
2.4.1	Paraffinblöcke und Herstellung von Paraffinschnitten	65
2.4.2	HE-Färbung histologischer Schnitte	65
2.4.3	Immunohistologie auf Paraffinschnitten nach der Avidin-Biotin-Methode (ABC)	65
2.4.4	Immunohistologie auf Paraffinschnitten nach der EnVision (Polymerkonjugat)-Methode	66

III. Ergebnisse	68
1. Herstellung des Köderkonstrukts	69
1.1 Klonierung des Köderkonstrukts	69
1.2 Überprüfung der Expression von pGBK-hcTerm	70
1.3 Überprüfung der Autoaktivierung von pGBK-hcTerm	71
2. Hefe-zwei-Hybrid-Screen	71
2.1 Kotransformation C-Terminus von Polyduktin und cDNS-Bibliothek	71
2.2 Erste Auswahl potentieller Kandidaten	71
2.3 Auswahl potentieller Kandidaten	73
3. Untersuchung der potentiellen Interaktion zwischen Polyduktin und OFD1	76
3.1 Klonierung verschiedener OFD1-Mutanten und der vollständigen cDNS	76
3.2 ONPG-Test	77
4. Untersuchung der potentiellen Interaktion zwischen Polyduktin und NPR1	79
4.1 Klonierung verschiedener NPR1-Mutanten	79
4.2 β -Galactosidase-Aktivität	80
4.3 α -Galactosidase-Aktivität	82
5. Untersuchung der potentiellen Interaktion zwischen Polyduktin und C7	83
5.1 Klonierung der kompletten C7-cDNS und einer Mutanten	83
5.2 β -Galactosidase-Aktivität	84
5.3 α -Galactosidase-Aktivität	85
5.4 GST-Proteininteraktionsstudien	86
6. Untersuchung der potentiellen Interaktion zwischen Polyduktin und Uromodulin	88
6.1 Klonierung der kompletten Uromodulin-cDNS und verschiedener Mutanten	88
6.2 β -Galactosidase-Aktivität	89
6.3 α -Galactosidase-Aktivität	91
6.4 GST-Proteininteraktionsstudien	92
6.5 Immunohistochemischer Nachweis von Nierenmarkern in Normalgewebe und Gewebe aus ARPKD-Patienten	95
6.6 Immunohistochemischer Nachweis von Polyduktin und Uromodulin in Normalgewebe und von Uromodulin in Gewebe aus ARPKD-Patienten	98
6.6.1 Immunohistochemischer Nachweis von Polyduktin und Uromodulin in Normalgewebe	99
6.6.2 Immunohistochemischer Nachweis von Uromodulin bei ARPKD-Patienten	102
IV. Diskussion	108
1. Potentielle Interaktion zwischen MLLT10 und Polyduktin	108
2. OFD1 interagiert in Hefe nicht mit dem C-Terminus von Polyduktin	109
3. Interaktion von NPR1 mit Polyduktin	111
4. Interaktion von C7 mit Polyduktin	114
5. Interaktion von Uromodulin mit Polyduktin	116
5.1 Die Aminosäuren 419 bis 444 von Uromodulin sind ausreichend für die Interaktion mit dem C-Terminus von Polyduktin	117
5.2 Partielle Kolo-kalisation von Polyduktin und Uromodulin	118
5.3 Expression von Uromodulin und Polyduktin während der Embryonalentwicklung	119
5.4 ARPKD-Patienten mit Abbruchmutationen zeigen einen signifikant erniedrigten Uromodulinpegel an der Membran	121
5.5 Mögliche physische Interaktion zwischen Uromodulin und Polyduktin	121
6. Ausblick	126
V. Literaturverzeichnis	128

VI. Anhang	141
A. Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Vektoren	141
B. Vektorkarten der hergestellten Vektoren	143
C. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon 6-19 mit der gDNS-Sequenz von UMOD aus der Ensembl-Datenbank	158
D. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon 8-28 mit der mRNS-Sequenz von MLLT10 aus der Ensembl-Datenbank	159
E. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon 11-23 mit der mRNS-Sequenz von C7 aus der Ensembl-Datenbank	161
F. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon 13-21 mit der mRNS-Sequenz von CYP1B1 aus der Ensembl-Datenbank	163
G. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon 14-18 mit der mRNS-Sequenz von C7 aus der Ensembl-Datenbank	164
H. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon 15-26 mit der mRNS-Sequenz von Col4A2 aus der Ensembl-Datenbank	165
I. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon 16-50 mit der gDNS-Sequenz von NPR1 aus der Ensembl-Datenbank	166
J. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon 18-12 mit der mRNS-Sequenz von OFD1 aus der Ensembl-Datenbank	168
K. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon IRATp970E0794D mit der mRNS-Sequenz von C7 aus der NCBI-Datenbank	169
L. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon IRAKp961A112133Q mit der mRNS-Sequenz von NPR1 aus der Ensembl-Datenbank	175
M. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon IRAMp995O172Q2 mit der mRNS-Sequenz von OFD1 aus der Ensembl-Datenbank	181
N. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon IRAUp969G0689D mit der mRNS-Sequenz von UMOD aus der Ensembl-Datenbank	186
Veröffentlichungen	190

Zusammenfassung

Die Autosomal-recessive polyzystische Nierenerkrankung ist eine der bedeutendsten Nephropathien im Kindesalter. Die meisten Patienten präsentieren bereits *in utero* bilateral vergrößerte zystische Nieren und eine kongenitale Leberfibrose.

Das für die Erkrankung verantwortliche Gen *PKHD1* (polycystic kidney and hepatic disease 1) umfasst 470 kb genomischer DNS und besteht aus 86 Exons, die für ein komplexes Muster von Spleißvarianten kodieren.

Der längste offene Leserahmen kodiert für ein Transkript von 12,2 kb und besteht aus 67 Exons. Das Genprodukt Polyduktin ist ein Typ I-Membranprotein von 4074 Aminosäuren mit einem großen N-terminalen Bereich und einem kurzen cytoplasmatischen C-Terminus. Der cytoplasmatische Bereich enthält vier potentielle Phosphorylierungsstellen, die möglicherweise in die Signaltransduktion involviert sind.

Die Funktion von Polyduktin ist bislang ungeklärt. Um interagierende Proteine von Polyduktin zu identifizieren wurde ein Hefe-zwei-Hybrid-Screen mit den cytoplasmatischen Aminosäuren 3881 bis 4074 von Polyduktin als Köder und einer humanen fötalen Nieren-cDNS-Bibliothek durchgeführt. Der experimentelle Ansatz führte zur Isolierung von vier Klonen die mit Polyduktin interagieren

Bei dem ersten potentiellen Interaktionspartner handelt es sich um „Mixed lineage leukaemia translocated to 10“ (MLLT10) einem Transkriptionsfaktor, dessen Funktion bislang ungeklärt ist. Aufgrund der Expression von MLLT10 in der Niere und die Möglichkeit einer physische Interaktion mit dem C-Terminus von Polyduktin nach dessen proteolytischen Spaltung und Translokation in den Kern, ist MLLT10 ein interessanter Kandidat.

Der zweite Interaktionspartner ist der „Natriuretische Peptid Rezeptor 1“ (NPR1). Mittels Hefe-zwei-Hybrid-Versuchen mit verschiedenen NPR1-Mutanten wurde der Bereich der Interaktion auf die Aminosäuren 985 bis 1010 von NPR1 eingegrenzt. Diese Interaktion wurde sowohl mittels eines quantitativen β -Galactosidase-Aktivitäts-Test als auch mit einem α -Galactosidase-Aktivitäts-Test verifiziert. Die Möglichkeit einer Interaktion *in vivo* ist gegeben, da NPR1 in den distalen Tubuli und Sammelrohren exprimiert wird und es sich um ein Membranprotein handelt, dessen ermittelte Interaktionsoberfläche ins Cytoplasma ragt. Eine Interaktion zwischen NPR1 und Polyduktin könnte eine Rolle bei Wachstum und Entwicklung der distalen Tubuli und der Sammelrohre übernehmen. Außerdem könnte eine fehlende Interaktion für die beobachtete Hypertonie der ARPKD-Patienten verantwortlich sein.

Ein weiterer Interaktionspartner ist die „Komplement Komponente-7“ (C7). Der für die Interaktion benötigte Bereich wurde mittels Hefe-zwei-Hybrid-Experimenten und Protein-Interaktionsstudien auf die Aminosäuren 645 bis 843 von C7 eingegrenzt. C7 ist eine Komponente des Membranangriffskomplexes, welches nicht nur in die Membran integriert werden kann, sondern auch Signaltransduktionswege beeinflusst. Die Daten dieser Arbeit sind ein erster Hinweis auf eine kausale Involvierung von C7 bei polyzystischen Nierenerkrankungen.

Der letzte und interessanteste Interaktionspartner, der identifiziert werden konnte ist Uromodulin. Das Protein ist eines der für glomerulozystische Nierenerkrankung verantwortlichen Proteine und auch für MDCK2 und FJHN verantwortlich.

Hefe-zwei-Hybrid-Experimente und GST-Proteininteraktionsstudien konnten den Bereich von Uromodulin, der für die Bindung benötigt wird, auf Aminosäuren 419 bis 444 eingrenzen. Immunohistochemische Untersuchungen auf humanem Nierengewebe verschiedener Entwicklungsstufen ergaben, dass Uromodulin bereits in der 15. Schwangerschaftswoche exprimiert wird, was eine Interaktion mit Polyduktin, das ebenfalls bereits in der 15. Schwangerschaftswoche exprimiert wird, während der Embryonalentwicklung zulässt. Eine Interaktion während der Organogenese könnte für die regelrechte Entwicklung der Niere von Bedeutung sein. Immunohistochemische Untersuchungen von ARPKD-Patienten ergaben, dass Abbruchmutationen in PKHD1 und dem damit entstehenden trunktierten Polyduktin eine signifikant erniedrigte Uromodulin-Menge an der Membran zur Folge hat. Möglicherweise spielt Polyduktin eine Rolle bei der Prozessierung von Uromodulin und ist für die richtige Lokalisation des Proteins verantwortlich.

Diese Arbeit zeigt erstmalig, dass Polyduktin und Uromodulin interagieren und Teil eines gemeinsamen Signalwegs sind, der in zystischen Nierenerkrankungen verschiedener Ätiologien gestört sein könnte.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
μ	Mikro-; Vorsilbe für den millionsten Teil einer physikalischen Einheit
1QCB1	<i>IQ motif containing B1</i> ; entspricht NPHP5
A	
Abb.	Abbildung
AD	autosomal-dominant
Ade	Adenin
ADE2	<i>Adenine 2</i> , Gen kodiert für Adenin
ADH1	<i>Alcohol dehydrogenase 1A</i>
ADPKD	<i>Autosomal dominant polycystic kidney disease</i> ; autosomal-dominante polyzystischen Nierenerkrankung
AEC	3-Amino-9-ethyl-carbazol
AHI1	<i>Abelson helper integration site 1 protein homolog</i> ; Gen kodiert für Joubertin
AJ	<i>Adherens junctions</i> ; Adhärenzverbindung
Amp	Ampicillin
ANP	<i>Atrial natriuretic peptide</i>
AP1	<i>Activating protein 1</i>
AR	autosomal-rezessiv
ARPKD	<i>Autosomal recessive polycystic kidney disease</i> ; autosomal-rezessive polyzystischen Nierenerkrankung
AS	Aminosäure(n)
ATF4	<i>Activating transcription factor 4</i>
B	
b	Basen
BB	<i>Basal body</i> ; Basalkörper
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BE	Belgien
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>
Bp	Basenpaar(e)
bpk	<i>BALB/c polycystic kidney</i> ; BALB/c polyzystische Niere
Bq	Becquerel
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	
c	Zenti-; Vorsilbe für den hundertsten Teil einer physikalischen Einheit
C	Carboxy oder <i>Complement Component</i> ; Komplement Komponente
C7	<i>Complement component 7</i> ; Komplement Komponente 7
CALM	<i>Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein</i>
CAML	<i>Calcium modulating cyclophilin ligand</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAS	p130Cas
Cdc42	<i>Cell division cycle 42</i>
cDNS	komplementäre DNS
Cen	Zentriole
CEP290	<i>Centrosomal protein of 290 kDa</i> ; entspricht NPHP6
Ci	Curie; Maßeinheit der radioaktiven Strahlung
CMV	Cytomegalie-Virus
CNP	<i>C-type natriuretic peptide</i>
cpk	<i>Congenital polycystic kidney</i> ; angeborene polyzystische Niere
Cys	Cystein

D

Da	Dalton; Maßeinheit für die Molekularmasse
DBD	DNS-Bindungsdomäne
DJ	<i>Desmosomal junction</i> ; Desmosomen
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nucleotidtriphosphat
Dp	Desmoplakin
Dr.	Doktor
ds	<i>double stranded</i> , doppelsträngig
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein-1
DTT	Dithiothreitol

E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E-cad	E-Cadherin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMA	<i>Epithelial membrane antigen</i>
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
ER	endoplasmatisches Reticulum
et al.	<i>et alia</i> (lat.); und andere
Ex	Exon

F

FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FAP	Fokales Adhäsionspunkt
FJHN	<i>Familial juvenile hyperuricemic nephropathy</i> ; familiäre juvenile hyperurikämische Nephropathie
for	<i>forward</i> ; Abkürzung für Oligonukleotide in Leserichtung
FR	Frankreich

G

g	Erdbeschleunigung oder Gramm
GCKD	<i>Glomerulocystic kidney disease</i> ; glomerulozystische Nierenerkrankungen
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> ; grün fluoreszierendes Protein
GLIS2	<i>GLI-similar 2</i> ; entspricht NPHP7
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GMP	<i>Guanosinemonophosphate</i>
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
GST	Glutathion-S-Transferase

H

h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEK293	<i>Human embryonic kidney cell culture</i>
HGFR	<i>Hepatocyte growth factor receptor</i>
His	Histidin
HIS3	Gen kodiert für Histidin
HNF-1 β	<i>Hepatocyte nuclear factor 1-beta</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> ; Meerrettich Peroxidase
HUSAR	Heidelberg UNIX Sequence Analysis Resources
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>

I

IPT	<i>Immunoglobulin like fold shared by Plexin transcription factor</i>
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-Galaktopyranosid
IQ-Motif	Isoleucin-Glutamin-Motiv

J

JAK	Janus-Kinase
JNK	Jun-N-terminale Kinase
JP	Japan

K

k	Kilo-; Vorsilbe für das tausendfache einer physikalischen Einheit
Kif3	<i>Kinesin family member 3</i>

L

l	Liter
lacZ	Gen kodiert für β -Galactosidase
LB	Luria Broth
LDL α	<i>Low density lipoprotein α</i>
Leu	Leucin

M

m	Milli-; Vorsilbe für den tausendsten Teil einer physikalischen Einheit, oder Meter
M	Mega-; Vorsilbe für das millionfache einer physikalischen Einheit, oder Molar, oder Morgan
MAC	<i>Membrane attack complex</i> ; Membranangriffskomplexes
max.	Maximum
MCKD	<i>Medullary cystic kidney disease</i> ; medulläre zystische Nierenerkrankung
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney Cells</i>
MEL1	Gen kodiert für α -Galactosidase
min	Minuten
MLLT10	<i>Mixed lineage leukemia translocated to 10</i>
Mody5	<i>Maturity onset diabetes of the young type 5</i>
MOPS	3-(N-Morpholin)-Propansulfonsäure

N

n	Nano-; Vorsilbe für den milliardsten Teil einer physikalischen Einheit
N	Amino
NaK-ATPase	Natrium-Kalium aktivierten Adenosin-Triphosphatase
N-cad	N-Cadherin
NEK8	<i>Never in mitosis A-related kinase 8</i> ; entspricht NPHP9
NF κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
NPHPx	Gen kodiert für Nephrocystin x
NPR1	<i>Natriuretic peptid receptor 1</i> ; Natriuretische Peptid Rezeptor 1
Nr.	Nummer
nt	Nucleotid

O

OD	optische Dichte
OFD1	<i>Oro-facio-digital-syndrome1</i> ; Oral fazial digital Syndrom 1, oder das verantwortliche Gen, oder das verantwortliche Protein
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid
ori	<i>origin of replication</i> ; Replikationsstartpunkt des Plasmids
orpk	<i>Oak ridge polycystic kidney</i>

P

p	Pico-; Vorsilbe für den billionsten Teil einer physikalischen Einheit
p. A.	<i>pro analysi</i> (lat.); chemischer Reinheitsgrad zur Analyse
PAX	Paxillin
PbH1	<i>Parallel beta Helix1</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> ; phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Polycystin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
Pg	Plakoglobin
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (lat.); Konzentration des Wasserstoffs in Säuren und Laugen
PHD	<i>Plant-homeodomain</i>
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKD	<i>Polycystic kidney diseases</i> ; polyzystische Nierenerkrankungen
PKD1	<i>Polycystic kidney disease 1</i> ; Gen kodiert für Polycystin-1
PKD2	<i>Polycystic kidney disease 2</i> ; Gen kodiert für Polycystin-2
PKHD1	<i>Polycystic kidney and hepatic disease 1</i> ; Gen kodiert für Polyduktin

R

Rac-1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
rev	<i>reverse</i> ; Abkürzung für Oligonukleotide in Gegenstrang-Richtung
RGEF	<i>Ras guanyl nucleotide exchange factor</i>
RNase A	Ribonuclease A
RNS	Ribonucleinsäure
RPGRIP1L	<i>RPGR-interacting protein 1-like protein</i> ; entspricht NPHP8
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcriptase PCR</i>
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule

S

s	Sekunden
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAP	<i>Shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
siRNS	<i>small interfering RNS</i>
SMART	<i>Simple modulat architecture research</i>
SOC	<i>super optimal catobolite repression</i>
ss	<i>single stranded</i> , einzelsträngig
SSW	Schwangerschaftswoche
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
SV40	<i>Simian vacuolating virus 40</i>

T

T7	RNS-Polymerase des Phagen T7
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAL	Talin
TB	Terrific Broth
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEN	Tensin
TJ	<i>Tight junction</i>
TNF α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
tRNS	Transfer-Ribonukleinsäure
Trp	Tryptophan

U

UAKD	<i>Uromodulin associated kidney diseases</i> ; Uromodulin-assoziierte Nierenerkrankungen
UK	<i>United Kingdom</i>
UMOD	Gen kodiert für Uromodulin
upm	Umdrehungen pro Minute
USA	<i>United States of America</i>
UV	Ultraviolett

V

VINC	Vinculin
------	----------

W

W	Watt
Wnt	Zusammenziehung aus den Genbezeichnungen <i>wingless</i> und <i>int</i>

X

X- α -Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- α -D-Galactopyranosid
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid

Y

YPD	<i>Yeast extract-peptone-dextrose</i>
-----	---------------------------------------

Z

z. B.	zum Beispiel
-------	--------------

I. Einleitung

1. Die Entwicklung der Niere

Während der Embryonalentwicklung entsteht die Niere in drei Entwicklungsstadien (siehe Abb. 1.1). Der Pronephros, der Mesonephros und der Metanephros entstehen aus derselben embryonalen Anlage, dem intermediären Mesoderm. Die zwei ersten Entwicklungsstufen haben einen transitorischen Charakter, während die definitive Niere sich aus dem Metanephros entwickelt.

Am Ende der dritten Schwangerschaftswoche (SSW) bildet sich aus dem kranialen Teil des nephrogenen Stranges der Pronephros. Er besteht nur aus wenigen Tubuli und bildet keine Glomeruli. Kaudal vom Pronephros entwickelt sich der Pronephrosgang, der in Richtung der Kloake wächst. Der Pronephros hat jedoch keine funktionelle Struktur, und bis zum Beginn der fünften Woche ist er bereits komplett zurückgebildet.

Im Laufe der vierten Woche, wenn der Pronephros noch nicht vollends abgebaut ist, entstehen die ersten Elemente des Mesonephros. Der Mesonephros bildet mehrere birnenförmige Mesonephros-Bläschen. Die schmalere Seite entwickelt sich zum Tubulus, während sich die breitere Seite zu einem Trichter differenziert, der als Bowman-Kapsel bezeichnet wird. Jede Bowman-Kapsel umgibt ein Kapillarknäuel, der Glomerulus. Anschließend verbinden sich die Mesonephros-Tubuli mit dem exkretorischen Pronephrosgang, welcher ab diesem Zeitpunkt als Mesonephros-Kanal bezeichnet wird. Dieser Kanal entwickelt sich in Richtung Kloake weiter, und gegen Ende der vierten Woche wird eine Verbindung der beiden etabliert.

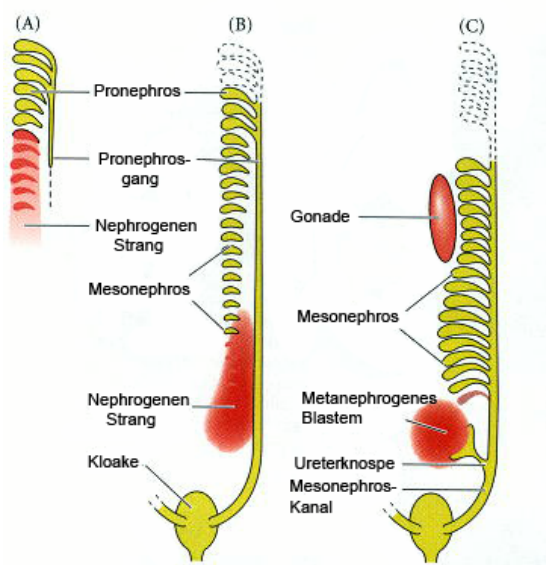


Abb. 1.1: Schematische Zeichnung der drei Entwicklungsstufen der Niere

Die Entwicklung der Niere erfolgt in drei Stufen.

A) Zuerst wird am Ende der dritten Schwangerschaftswoche der Pronephros aus dem kranialen Teil des nephrogenen Stranges gebildet. B) Diese Struktur ist noch funktionsunfähig und bereits ab der fünften Woche wieder komplett zurückgebildet. Bevor dies geschieht, werden die ersten Elemente des Mesonephros gebildet. C) Noch bevor der Mesonephros komplett degeneriert ist, entstehen bereits die ersten Elemente des Metanephros.

(Bild verändert nach: Gilbert, 2000)

Der Metanephros wird gebildet bevor der Mesonephros komplett zurückgebildet ist, und entsteht aus zwei spezifischen Elementen. Aus dem kaudalen Teil des nephrogenen Stranges, der jetzt als metanephrogenes Blastem bezeichnet wird, entstehen die Nephrone. Das exkretorische System, welches die Sammelrohre, Nierenkelche, Nierenbecken und Harnleiter umfasst, entwickelt sich dagegen aus der Ureterknospe. Hierbei handelt es sich um eine Abzweigung vom kaudalen Ende des Mesonephros-Kanals (siehe Abb. 1.2 A).

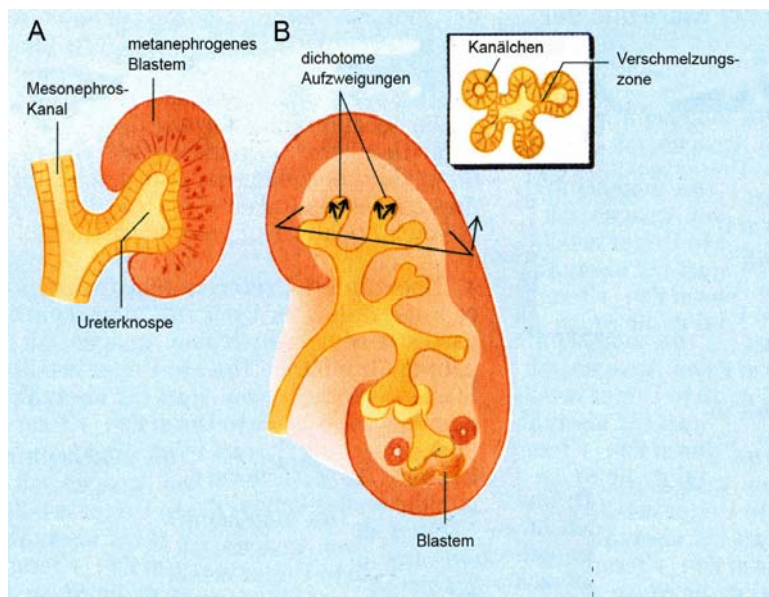


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Aufzweigung der Ureterknospe

A) Die Ureterknospe zweigt sich vom Mesonephros-Kanal ab und wächst in das metanephrogene Blastem hinein. B) Schematische Darstellung der dichotomen Aufzweigung der Ureterknospe. Der Einsatz zeigt die Vereinigung mehrerer dichotomer Verzweigungen.

(Bild verändert nach: Drews, 1993)

Die kraniale Spitze der Ureterknospe ist leicht verdickt und wird als ampulläres Endstück bezeichnet, sie wächst in Richtung des metanephrogenen Blastems. Sobald diese erreicht wird, untergeht die Ureterknospe einige dichotome Teilungen, wobei jeder der entstandenen Äste sich wiederum dichotom aufteilen kann (siehe Abb. 1.2 B). Die ersten drei bis fünf Teilungsgenerationen vereinigen sich, um das Nierenbecken zu formen, die folgenden drei bis fünf Generationen bilden die Nierenkelche, und die letzten sieben bis acht bilden die Sammelrohre. Ab dem Ende der siebten Woche entwickeln sich das Sammelrohrsystem und die Nephrone parallel.

In der Aufzweigung der Sammelrohre lassen sich drei Phasen unterscheiden (siehe Abb. 1.3). In der ersten Phase (Abb. 1.3 A) finden dichotome Teilungen für etwa sechs bis acht Generationen statt. Einer der Äste induziert die Bildung eines Nephrons und der andere entwickelt sich zum ampullären Endstück, das sich wiederum dichotom teilen kann.

In der zweiten Phase (Abb. 1.3 B), die die 16. bis 24. Schwangerschaftswoche umfasst, finden keine dichotomen Teilungen mehr statt. Jeder Ast kann die Bildung von sechs bis acht weiteren Nephronen induzieren. Hierbei wird am Übergang jedes neugebildeten Nephrons direkt das nächste Nephron induziert. Hierdurch sind die Nephronen arkadenartig miteinander verbunden. In jeder Arkade hat sich das erste Nephron während der ersten Periode der Nephrogenese gebildet.

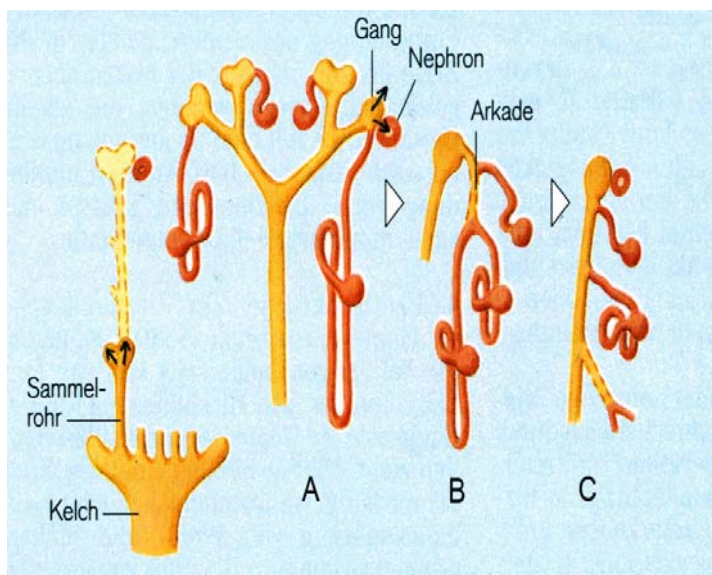


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Aufzweigung der Sammelrohre und der Entstehung der Nephronarkaden

A) In der ersten Phase der Sammelrohrenaufzweigung teilen sich die ampullären Endstücke der Ureterknospe dichotom. Der eine Ast induziert die Bildung eines Nephrons, aus dem anderen entwickelt sich ein ampulläres Endstück, das sich wiederum dichotom aufteilen kann. B) In der zweiten Phase wird direkt nach jedem gebildeten Nephron das nächste induziert, dadurch sind die Nephronen arkadenartig miteinander verbunden. C) In der dritten Phase wachsen die ampullären Endstücke weiter ins Blastem ein und dichotome Teilungen finden erneut statt.

(Bild verändert nach: Drews, 1993)

Die 24. bis 36. Schwangerschaftswochen werden in der letzten Phase zusammengefasst (Abb. 1.3 C). In dieser Phase wachsen die ampullären Endstücke der Ureterknospe weiter in das metanephrogene Blastem hinein und es erfolgen erneute dichotome Teilungen. Nach jeder Teilung induziert eine Aufzweigung ein Nephron und aus der anderen Aufzweigung entwickelt sich ein ampulläres Endstück. Wenn das ampulläre Endstück nach vier bis sieben Teilungen den äußeren Bereich des Cortex unter der Kapsel erreicht, werden keine neuen Nephronen mehr gebildet. Somit befinden sich die zuletzt gebildeten Nephronen direkt unter der Nierenkapsel.

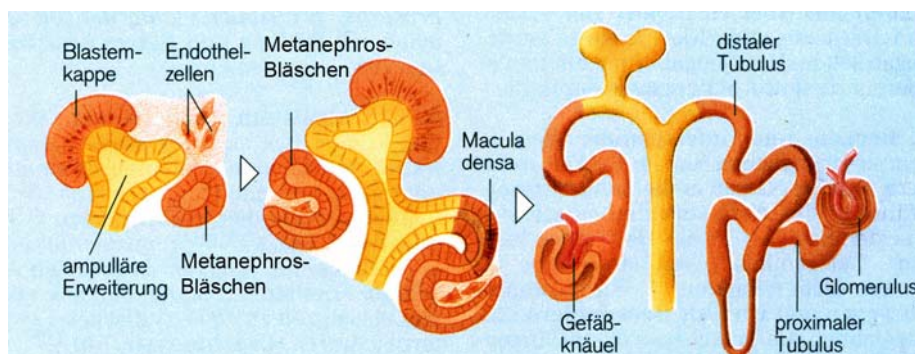


Abb. 1.4: Differenzierung des Nierenbläschens zum Nephron

Die ampulläre Erweiterung induziert die Bildung eines Metanephros-Bläschens in der Blastem-Kappe die sie umgibt. Diese entwickelt sich zu einem S-förmiges Kanälchen, welches in drei Abschnitte unterteilt werden kann. Der obere entwickelt sich zum distalen Tubulus und zum aufsteigenden Ast der Henle-Schleife und der mittlere entwickelt sich zum absteigenden Ast der Henle-Schleife und den proximalen Tubulus. Aus dem unteren Abschnitt entwickelt sich die Bowman-Kapsel, die den Glomerulus, ein Gefäßknäuel, umgibt. Wenn das Bläschen am anderen Ende mit dem Sammelrohr fusioniert, ist das Nephron funktionsfähig.

(Bild verändert nach: Drews, 1993)

Die Nephronen entwickeln sich aus dem metanephrogenen Blastem (Abb. 1.4), das die Sammelrohre wie eine Kappe umgibt. Ein Signal aus der Ureterknospe induziert eine Zellkondensation im nephrogenen Blastem, aus dem sich das Metanephros-Bläschen entwickelt. Diese werden länger und bilden ein S-förmiges Kanälchen. Es können drei Abschnitte unterschieden werden. Der obere Abschnitt entwickelt sich zum distalen Tubulus und zum aufsteigenden Ast der Henle-Schleife, während aus dem mittleren Abschnitt der absteigende Ast der Henle-Schleife und der proximale Tubulus hervorgehen. Aus dem unteren Abschnitt entwickelt sich die Bowman-Kapsel, welche ein Kapillarknäuel (Glomerulus) umgibt. Gleichzeitig fusioniert das Bläschen am anderen Ende mit dem Sammelrohr, so dass das Nephron funktionsfähig ist. Ab der sechsunddreißigsten Schwangerschaftswoche werden keine neuen Nephronen mehr gebildet. Das Volumen der Glomeruli nimmt zu und die Henle-Schleife, sowie proximale und distale Tubuli werden länger und gewunden. Dieser Prozess setzt sich auch nach der Geburt fort bis zur Reife [Gilbert-Barness, 2007; Drews, 1993].

Die reife Niere kann in die äußere Nierenrinde (Cortex) und das innere Nierenmark (Medulla) unterteilt werden. Das exkretorische System besteht im Wesentlichen aus den Sammelrohren, den Nierenkelchen, dem Nierenbecken, und dem Harnleiter (siehe Abb. 1.5).

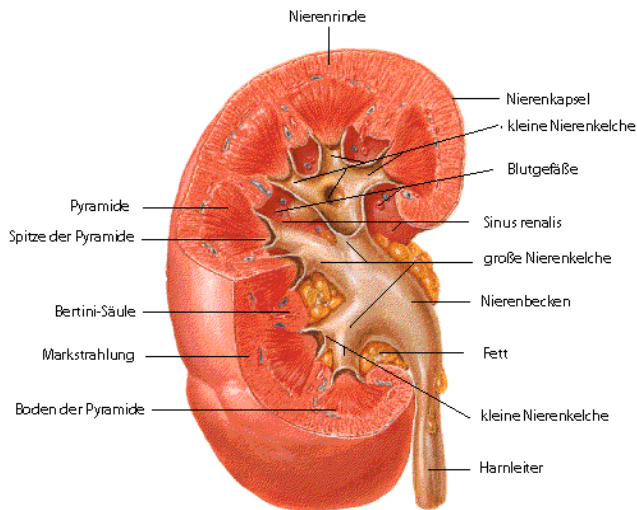


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der humanen Niere im Längsschnitt

Die Niere kann unterteilt werden in die äußere Nierenrinde (Cortex) und das innere Nierenmark (Medulla). Dargestellt ist das exkretorische System, welches sich aus den Sammelrohren (nicht dargestellt), den Nierenkelchen, dem Nierenbecken, und dem Harnleiter zusammensetzt.

(Bild verändert nach: <http://galileo.phys.virginia.edu/classes/304/kidney.gif>)

Das Nephron stellt die funktionelle Einheit der Niere dar. Diese besteht aus folgenden Elementen, der Bowman-Kapsel, die ein Kapillarknäuel (Glomerulus) umgibt, dem proximalen Tubulus, der Henle-Schleife und dem distalen Tubulus. Der Blutdruck presst Wasser, Harnstoff, Salze und andere niedermolekulare Solute aus dem in Glomerulus enthaltene Blut in das Lumen der Bowman-Kapsel. Das so entstandene Ultrafiltrat gelangt zunächst in den proximalen Tubulus, wo Wasser und Salze reabsorbiert werden. Im absteigenden Ast der Henle-Schleife wird die Reabsorption von Wasser fortgesetzt. Der aufsteigende Ast dagegen ist undurchlässig für Wasser und dient der Reabsorption von Natriumchlorid. Anschließend gelangt das Ultrafiltrat in den distalen Tubulus, der eine wichtige Rolle in der selektiven Sekretion und Reabsorption spielt. Eine letzte Möglichkeit für Wasserreabsorption bilden die Sammelrohre, bevor die Flüssigkeit in das Nierenbecken fließt.

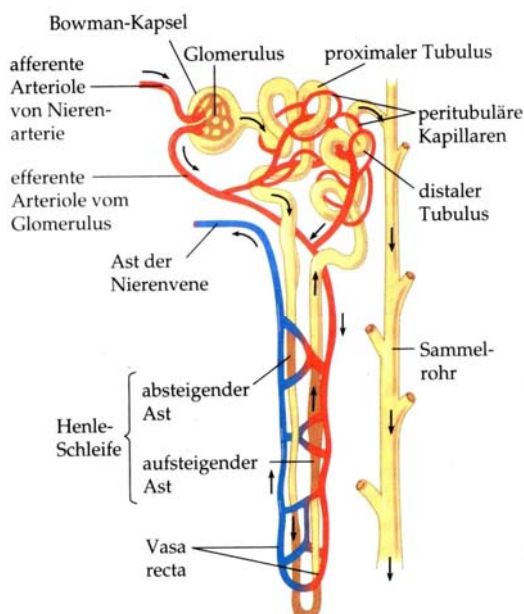


Abb. 1.6: Schematischer Aufbau des Nephrons

Die funktionelle Einheit der Niere wird vom Nephron gebildet. Sie besteht im Wesentlichen aus folgenden Abschnitten: der Bowman-Kapsel, die den Glomerulus umgibt, dem proximalen Tubulus, der Henle-Schleife und dem distalen Tubulus, der in das Sammelrohr mündet, das von mehreren Nephronen geteilt wird.

(Bild aus: Campbell, 1997)

2. Polyzystische Nierenerkrankungen

Zystische Nierenerkrankungen sind eine heterogene Gruppe von genetischen, erworbenen und sporadischen Erkrankungen. Eine frühe Klassifikation erfolgte nach morphologischer Charakterisierung. In den letzten Dekaden wurden jedoch klinische, radiologische und genetische Kriterien für die Beurteilung hinzugezogen. Heute unterscheidet man zwischen erworbenen Zystennieren, z. B. als Folge einer Dialysebehandlung, welche als „multizystisch“ bezeichnet werden und hereditären, monogenetischen Erkrankungen, welche als „polyzystisch“ bezeichnet werden.

Polyzystische Nierenerkrankungen (PKD: Polycystic kidney diseases) sind häufig die Ursache für Nierenversagen bei Kindern und im Erwachsenenalter. Diese Erkrankungen zeichnen sich durch die Entstehung von flüssigkeitsgefüllten Zysten in der Niere aus, wobei die Zysten sich aus der Epithelschicht der Nephronen und des Sammelrohrsystems entwickeln. Nadasdy et al. [1995] zeigten, dass das Epithel der Zysten eine erhöhte Proliferationsrate aufweist, welche möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung dieser Zysten spielt. Allerdings ist der genaue Mechanismus noch ungeklärt.

Die hereditären polyzystischen Nierenerkrankungen, welche bilateral auftreten, umfassen Nephronophthise, medulläre zystische Nierenerkrankung (MCKD: medullary cystic kidney disease), glomerulozystische Nierenerkrankungen (GCKD: glomerulocystic kidney disease), autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD: autosomal dominant polycystic kidney disease) sowie autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD: autosomal recessive polycystic kidney disease) (siehe Tab. 1.1). Die Schwere der Symptome, sowie das Alter in dem die Krankheit erstmals auftritt, variiert stark zwischen den verschiedenen polyzystischen Nierenerkrankungen.

Tab. 1.1: Übersicht der hereditären polyzystischen Nierenerkrankungen

Tabellarische Darstellung der verschiedenen hereditären polyzystischen Nierenerkrankungen, die verantwortlichen Gene und ihre genomische Lage, sowie die von ihnen kodierten Proteine. AD: autosomal-dominant, AR: autosomal-rezessiv

(Tab. verändert und aktualisiert nach: Wilson, 2004; Dixon-Salazar et al., 2004; Wilson und Goilav, 2007; Salomon et al., 2008)

Erkrankung	Vererbung	Gen	Chromosom-Lokalisation	Protein	Molekulargewicht kDa
Polyzystische Nierenerkrankungen					
Autosomal-dominant	AD	PKD1	16p13.3	Polycystin-1	462
Autosomal-dominant	AD	PKD2	4q21	Polycystin-2	110
Autosomal-rezessiv	AR	PKHD1	6p21-23	Polyduktin	447
Nephronophktise					
Juvenil	AR	NPHP1	2q12-13	Nephrocystin-1	83
Infantil	AR	NPHP2	9q22-31	Inversin	98
Juvenil	AR	NPHP3	3q21-22	Nephrocystin-3	143
Juvenil	AR	NPHP4	1p36	Nephrocystin-4	134
Juvenil	AR	NPHP5 (1QCB1)	3q21.1	Nephrocystin-5	69
Juvenil	AR	NPHP6 (CEP290)	12q21.32	Nephrocystin-6	290
Juvenil	AR	NPHP7 (GLIS2)	16p	Glis2	56
Juvenil	AR	NPHP8 (RPGRIPL)	16q	RPGRIPL	151
Juvenil	AR	NPHP9 (NEK8)	17q11	NEK8	75
Juvenil	AR	AHI1	6q23.3	Jouberin	137
Medulläre zystische Nierenerkrankungen					
	AD	MCKD1	1q21	?	?
	AD	MCKD2 (UMOD)	16p12	Uromodulin	85 & 95
Glomerulozystische Nierenerkrankung					
	AD	HNF-1β UMOD	17q12 16p12	HNF-1β Uromodulin	61 85 & 95

2.1 Nephronophktise

Die Nephronophktise ist eine autosomal-rezessiv vererbte Nierenerkrankung, welche in verschiedene Populationen unterschiedlich stark auftritt. In Finnland tritt sie mit einer Inzidenz von 1: 100.000 auf, während sie in Canada 1: 50.000 und in der USA nur mit einer Inzidenz von etwa 1: 1.000.000 auftritt [Salomon et al., 2008]. Trotz dieser niedrigen Inzidenz ist es der häufigste genetische Grund für terminales Nierenversagen im Kindesalter und manifestiert sich meistens bis zum zwanzigsten Lebensjahr [Hildebrandt und Otto, 2000]. Die Krankheit ist charakterisiert durch normal große Nieren, die bilateral Zysten entwickeln, welche sich hauptsächlich im Grenzbereich von Medulla und Cortex befinden. Die Zysten entstehen in den distalen Tubuli und den Sammelrohren.

Weitere Charakteristika der Krankheit sind Wachstumsverzögerung, tubulo-interstitielle Fibrose und das Kollabieren einiger Tubuli, während andere eine Atrophie mit verdickter Basalmembran aufweisen. Bei der infantilen Form werden diese typischen verdickten

Basalmembranen nicht gebildet [Salomon et al., 2008]. Eine Erkrankung anderer Organe kann einhergehen. Bei zehn Prozent der Patienten wird eine Retinitis pigmentosa festgestellt (Senior-Løken-Syndrom) [Otto et al., 2005], und auch Leberfibrose ist häufig mit Nephronophktise assoziiert.

Bislang werden zehn verschiedene Formen der Nephronophktise unterschieden. Bei Typ I handelt es sich um eine Form, welche durch Mutationen im NPHP1-Gen entsteht [Antignac et al., 1993; Hildebrandt et al., 1993], das in 85 Prozent alle Nephronophktise-Fälle betroffen ist [Konrad et al., 1996]. Bei den meisten Patienten mit Typ I-Nephronophktise konnte eine homozygote Deletion von 250 kb im NPHP1-Gen nachgewiesen werden [Konrad et al., 1996]. Das Gen kodiert für das Protein Nephrocystin-1, das in den primären Zilien der Niere lokalisiert ist, wo es vermutlich an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt ist [Benzing et al., 2001]. Für der Maus-Homolog von Nephrocystin-1 konnte eine Koloalisation und Interaktion mit dem Protein p130Cas nachgewiesen werden, das in den fokalen Adhäsionskontakten lokalisiert ist [Donaldson et al., 2000].

Nephronophktise Typ II ist die infantile Form der Nephronophktise und wird von Mutationen im NPHP2-Gen verursacht. Das NPHP2-Gen-Produkt wird als Inversin bezeichnet. Dieses Protein interagiert mit Nephrocystin-1 und ist ebenfalls in den Zilien lokalisiert [Otto et al., 2003]. Eine 125 kDa Inversin-Isoform konnte an Zell-Zell-Kontakten nachgewiesen werden, wo es mit N-Cadherin und Cateninen interagiert, während zwei weitere Inversin-Isoformen von 140 und 90 kDa im Zellkern nachgewiesen wurden, wo letztere mit β -Catenin interagiert [Nürnberg et al., 2002].

2003 konnten Olbrich et al. das Gen identifizieren, welches die dritte Form von Nephronophktise (Typ III) verursacht. Das Gen wurde als NPHP3 bezeichnet und kodiert für Nephrocystin-3. Weiterhin konnten sie nachweisen, dass dieses Protein mit Nephrocystin-1 interagiert.

Nephronophktise Typ IV wird von Mutationen im Gen NPHP4 ausgelöst. Diese wurde 2002 von Mollet et al. identifiziert. Auch das Genprodukt Nephrocystin-4 ist in der Lage mit Nephrocystin-1 zu interagieren [Mollet et al., 2002]. Wie die anderen Nephrocystine lokalisiert Nephrocystin-4 an den Zilien, wo es mit α -Tubulin assoziiert ist. Zudem wurde dieses Protein in Zentrosomen und im Komplex mit den Proteinen p130Cas und Pyk2 nachgewiesen, was zu der Vermutung führt, dass dieses Protein an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt ist.

Nephronophktise Typ V ist mit dem Senior-Løken-Syndrom assoziiert. Otto et al. konnten 2005 nicht nur NPHP5 (IQBC1) als verantwortliches Gen identifizieren, sondern auch

nachweisen, dass das Genprodukt Nephrocystin-5 mit dem Protein „retinitis pigmentosa GTPase regulator“ interagiert. Beide Proteine sind in den Zilien der Photorezeptoren sowie den Nierenepithelzellen lokalisiert. Zudem besitzt das Protein zwei IQ-Domäne (benannt nach dem Isoleucin-Glutamin (IQ)-Motiv), welche aus sieben „turn-Helix“-Motiven bestehen und in der Lage sind, Calmodulin Ca^{2+} -unabhängig zu binden.

Die sechste Form der Nephronophtise, Typ VI, wird durch Mutationen im NPHP6-Gen (SEP290) verursacht [Sayer et al., 2006]. Diese Form ist mit schwerer Retinitis pigmentosa assoziiert. Das Protein Nephrocystin-6 konnte in den Zentrosomen von Nierenepithelzellen und in primären Zilien der Photorezeptoren nachgewiesen werden [Chang et al., 2006]. Es interagiert mit dem Transkriptionsfaktor ATF4, der in der cAMP-abhängigen Nierenzystenbildung impliziert ist [Sayer et al., 2006]. Diese Form der Nephronophtise ist mit dem Joubert-Syndrome assoziiert. Patienten sind geistig behindert und weisen in neonatalen Alter respiratorische Unregelmäßigkeiten auf [Tory et al., 2007].

Nephronophtise Typ VII wird durch Mutationen in dem NPHP7-Gen (GLIS2) verursacht. Dieses Gen kodiert für einen Zink-Finger-Transkriptionsfaktor. Es scheint sich bei Type VII um eine seltene Form von Nephronophtise zu handeln. Bislange wurde nur bei drei Geschwister Mutationen in diesem Gen identifiziert [Attanasio et al., 2007]. Attanasio et al. [2007] zeigten zudem in kultivierten Nierenzellen, dass das Glis2-Protein in den primären Zilien und dem Nukleus lokalisiert ist. Auf murinem Gewebe zeigten sie außerdem, dass das Protein in allen Nierentubuli und in Epithelzellen der Bowman-Kapsel exprimiert wird.

Typ VIII wird durch Mutationen in dem NPHP8-Gen (RPGRIP1L) verursacht, welches für das Protein RPGRIP1L kodiert [Wolf et al., 2007]. Es handelt sich hier um ein Protein das im Cytoplasma vorliegt und mit Nephrocystin-4 und -6 in Basalkörpern, Zentrosomen und primären Zilien der Nierentubuli kolokalisiert [Delous et al., 2007; Arts et al., 2007]. Eine Interaktion mit Nephrocystin-4 konnte nachgewiesen werden [Arts et al., 2007].

Mutationen im NPHP9-Gen (NEK8) verursachen Nephronophtise Typ IX. Das Protein ist wie alle Nephrocystine an den primären Zilien und an den Zentrosomen lokalisiert. Zellkultur-Experimente mit mutierter muriner NPHP9-cDNS zeigten, dass die drei Mutationen, die bislang in Patienten identifiziert wurden, negative Auswirkungen auf die Lokalisation des Proteins in den Zilien und Zentrosomen hatten [Otto et al., 2008].

Ein weiteres Gen wird mit Nephronophtise assoziiert, das AHI1-Gen, welches für das Protein Joubertin kodiert und für Nephronophtise Typ X verantwortlich ist. Mutationen in diesem Gen führen zum Joubert-Syndrome, welches häufig als isolierte Erkrankung auftritt, aber in einigen Fällen mit Nephronophtise assoziiert ist [Dixon-Salazar et al., 2004; Utsch et al.,

2006]. Wie einige der anderen Nephronophtise-Proteine ist auch dieses Protein in der Lage mit Nephrocystin-1 zu interagieren. Das Protein ist in den Sammelrohren der Niere lokalisiert. In Zellkultur-Experimenten konnte gezeigt werden, dass es an Zell-Zell-Kontakten, primären Zilien und Basalkörperchen, sowie am Zentrosomen exprimiert wird [Eley et al., 2008].

2.2 Medulläre zystische Nierenerkrankungen

Bei den medullären zystischen Nierenerkrankungen handelt es sich um eine autosomal-dominant vererbte tubulo-interstitielle Nephropathie. Weitere phänotypische Merkmale sind Hyperurikämie und Gicht. Ähnlich wie bei Nephronophtise sind die Zysten auf den corticomedullären Bereich begrenzt. Die Nieren sind normal groß, oder bilateral geringfügig verkleinert. Anders als bei der Nephronophtise manifestiert sich die Erkrankung klinisch milder und typischerweise erst im Erwachsenenalter.

Es gibt zwei Formen der Erkrankung, MCKD1 und MCKD2, die sich jedoch klinisch nicht unterscheiden lassen. Hodaňová postulierte eine dritte Form der MCKD, dessen verantwortliches Gen auf Chromosom 1q41 kartiert wurde [Hodaňová et al., 2005].

MCKD1 wird durch Mutationen in einem noch unbekannten Gen verursacht, welches 2004 auf einen chromosomalen Bereich von weniger als 650 kb auf Chromosom 1 eingegrenzt werden konnte [Wolf et al., 2003a]. Nach Mutationsanalyse von 37 Kandidatengenen konnten in drei Genen, AK000210, CCT3 und SCAMP3 Sequenzabweichungen identifiziert werden, welche nur bei Patienten nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob tatsächlich nur ein einziges Gen für MCKD1 verantwortlich ist [Wolf et al., 2006].

Mutationen im UMOD-Gen, welches für das Protein Uromodulin (auch Tamm-Horsfall-Protein genannt) kodiert, verursachen MCKD2. Interessanterweise wurde bei Patienten mit Mutationen im Bereich 1q41 eine reduzierte Uromodulinexpression beobachtet [Hodaňová et al., 2005]. Somit ist es möglich, dass das Gen welches die postulierte dritte Form von MCKD verursacht, in dieselben Signalwege involviert ist wie Uromodulin.

Uromodulin ist ein Glykoprotein, das über eine Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) in der Außenseite der Zellmembran verankert ist [Rindler et al. 1990; Cavallone et al., 2001]. Es wurde jedoch auch im Cytoplasma nachgewiesen [Peach et al., 1988; Rindler et al. 1990; Hodaňová et al., 2005]. Uromodulin wird ausschließlich in der Niere exprimiert [Pennica et al., 1987], wo es im aufsteigende Ast der Henle-Schleife und in den distalen Tubuli lokalisiert ist [Peach et al., 1988; Sikri et al., 1979; diese Arbeit].

Obwohl Uromodulin bereits 1950 von Igor Tamm und Frank Horsfall aus Urin isoliert wurde, ist bis heute seine Funktion noch nicht völlig geklärt. Man vermutet, dass die Fähigkeit des Proteins, Protofilamenten zu bilden, zu einer gelartigen Struktur führt, die für die Wasserundurchlässigkeit des aufsteigenden Asts der Henle-Schleife verantwortlich ist. Außerdem scheint das Protein eine Rolle in immunologischen Reaktionen zu spielen, indem es Cytokine wie TNF α und Interleukin-1 α bindet, sowie an Leukocyten und diese anschließend aktivieren kann. Zudem erschwert das Protein die Entstehung von Harnwegsinfektionen, indem es die Bindung von *E. coli* an Nierenzellen verhindert [Hart et al., 2002].

Es wurde für längere Zeit angenommen, dass familiäre juvenile hyperurikämische Nephropathie (FJHN: familial juvenile hyperuricemic nephropathy) und MCKD2 zwei unabhängige Nierenerkrankungen darstellen, obwohl beide Krankheiten einen ähnlichen klinischen Verlauf zeigen. Nachdem jedoch für beide Krankheiten Mutationen im UMOD-Gen als Ursache nachgewiesen werden konnte, betrachtet man sie nun als allelische Heterogenität der gleichen Krankheit, und die Bezeichnung Uromodulin-assoziierte Nierenerkrankung (UAKD: Uromodulin associated kidney disease) wurde vorgeschlagen [Hart et al., 2002; Turner et al., 2003].

2.3 Glomerulozystische Nierenerkrankung

Die glomerulozystische Nierenerkrankung ist eine selten auftretende Erkrankung der Niere, welche autosomal-dominant vererbt wird oder auch sporadisch auftreten kann. Die erbliche Form ist assoziiert mit hypoplastischen oder normalen Nieren, aber auch vergrößerte Nieren wurden beobachtet. Die Bowman-Kapseln sind erweitert, und die Kapillarknäuel sind entweder reduziert oder kollabiert.

Welche Gene in GCKD involviert sind, ist noch nicht vollständig geklärt. Es konnten bereits zwei Gene identifiziert werden, die für die Erkrankung verantwortlich sind. In zwei Familien mit einer hypoplastischen Form der GCKD und frühzeitigen Diabetes konnten Mutationen im HNF-1 β -Gen (HNF-1 β : hepatocyte nuclear factor) identifiziert werden [Bingham et al., 2001]. In zwei anderen Familien, deren Mitglieder keine Anzeichen von Diabetes zeigten, wurden Mutationen im UMOD-Gen als Ursache der Erkrankung nachgewiesen. [Rampoldi et al., 2003; Lens et al., 2005].

Jedoch konnten in einigen Fällen keine Mutationen in diesen Genen nachgewiesen werden. Somit ist zu erwarten, dass ein weiteres Gen oder weitere Gene involviert sind.

2.4 Autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung

Eine der am häufigsten auftretenden genetischen zystischen Nierenerkrankungen ist die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung, welche mit einer Inzidenz von 1:800 mit vollständiger Penetranz auftritt [Wilson und Goilav, 2007]. Die Erkrankung manifestiert sich typischerweise erst im Erwachsenenalter, obwohl Zysten zum Teil bereits *in utero* nachgewiesen werden können. Pathologisch ist die Erkrankung charakterisiert durch die Entwicklung von Zysten in Cortex und Medulla der Nieren, die hierdurch massiv vergrößert sind. Zysten können in allen Abschnitten des Nephrons, außer in den Glomeruli, entstehen und sich während ihrer Größenzunahme von diesen abkapseln und lösen. Auch andere Organe, wie Leber, Pankreas und Dünndarm, sind von Zystenbildung betroffen. Die Symptome äußern sich in Bluthochdruck, Polyurie, Infektionen der Harnwege, Nierensteinen und Schmerzen im Rücken, in der Seite oder im Unterleib [zusammengefasst in Gabow, 1993; Wilson und Goilav, 2007]. Etwa die Hälfte der Patienten entwickelt eine terminale Niereninsuffizienz bis zum sechzigsten Lebensjahr [Churchill et al., 1984].

ADPKD kann in zwei verschiedene Typen unterteilt werden, welche sich phänotypisch gleichen. Im Allgemeinen ist der Verlauf von Typ II milder und das Manifestationsalter liegt höher als bei Typ I [Torra et al., 1996].

2.4.1 ADPKD Typ I

In 85 bis 90 Prozent der ADPKD-Fälle handelt es sich um Typ I, welcher durch eine Mutation im PKD1-Gen verursacht wird [The International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995]. Das PKD1-Gen erstreckt sich über 52 kb genomische DNS und umfasst 46 Exons. Ein Transkript von 14,2 kb kodiert für das Protein Polycystin-1 (PC-1), ein Multidomänen-Membranprotein von 4304 Aminosäuren. Das Protein hat einen großen extrazellulären aminoterminalen Bereich, elf Transmembrandomänen, und einen kurzen cytoplasmatischen carboxyterminalen Bereich [Hughes et al., 1995; Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1997] (siehe Abb. 1.7). Der extrazelluläre Bereich des Proteins enthält mehrere Motive, welche die Bindung an Matrix- und Zellmembran-Proteine vermitteln, während die intrazelluläre Bereiche mehrere Phosphorylierungsstellen aufweist [Hughes et al., 1995].

Für Polycystin-1 konnte nachgewiesen werden, dass es an fokalen Adhäsionskontakte lokalisiert ist, und mit mehreren Adhäsionsproteinen assoziiert ist, wie Vinculin, Paxillin [Wilson et al., 1999], Talin, p130Cas, FAK (focal adhesion kinase) und pp60-src die alle in

einem Komplex vorkommen [Geng et al., 2000] (siehe Abb. 1.7). In ADPKD-Fällen, in denen das Polycystin-1 mutiert und damit funktionsunfähig ist, wird die FAK nicht zu diesem Komplex rekrutiert, dadurch nicht phosphoryliert und aktiviert, was somit möglicherweise dazu führt, dass die weitere Signaltransduktion unterbunden wird [Geng et al., 2000].

Das Protein ist auch in Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. Hier kolokalisiert es mit E-Cadherin und α -, β - und γ -Catenin [Huan und van Adelsberg, 1999]. In ADPKD-Patienten wird statt E-Cadherin das mehr fötale N-Cadherin gefunden, was eine schwächere Zell-Zell-Verbindung zur Folge hat (siehe Abb. 1.7) [Roitbak et al., 2004]. Zudem befindet sich Polycystin-1 in den primären Zilien der Niere, wo man vermutet, dass es die Funktion eines Mechanosensors übernimmt [Nauli et al., 2003].

Aufgrund seiner Struktur wurde für Polycystin-1 eine Rolle in der Signaltransduktion postuliert und diese konnte für mehrere Signaltransduktionswege gezeigt werden, so im JAK/STAT-Weg [Bhunia et al., 2002], im JNK-AP1-Signalweg, wobei PKC α , Cdc42, und Rac-1 eine wichtige Rolle spielen [Arnould et al., 1998] und in Wnt/ β -Catenin-Weg, indem es lösliches β -Catenin stabilisiert und somit den Wnt-Signalweg beeinflusst [Kim et al., 1999].

Eine Funktion von Polycystin-1 bei der Proteinprozessierung wäre auch denkbar. In ADPKD-Patienten sind einige Proteine in den Nierenepithelzellen falsch polarisiert. Einige Proteine, wie zum Beispiel die NaK-ATPase, die normalerweise in der Basolateralmembran vorkommen, befinden sich in der apikalen Membran. Möglicherweise handelt es sich hier um einen direkten Effekt: Zatti et al. [2005] konnten nachweisen, dass Polycystin-1 mit der NaK-ATPase α -Untereinheit interagieren kann. Interessanterweise wird auch Polycystin-1 selbst in ADPKD-Fällen nicht richtig prozessiert und befindet sich hauptsächlich im Cytoplasma, statt in der Membran [zusammengefasst in Wilson und Goilav, 2007].

Chauvet et al. [2004] zeigten, dass Polycystin-1 gespalten wird und der C-Terminus in den Nukleus transloziert. Hier ist der C-Terminus in der Lage AP1 zu aktivieren, sowie den Wnt-Signalweg zu inhibieren [Lal et al., 2008]. Eine Mutation, die die Abspaltung des Polycystin-1 C-Terminus blockierte, führte in Mäusen zur Zystenbildung, was auf eine Rolle des C-terminalen Fragments in der Entwicklung der Tubuli hinweist [Yu et al., 2007].

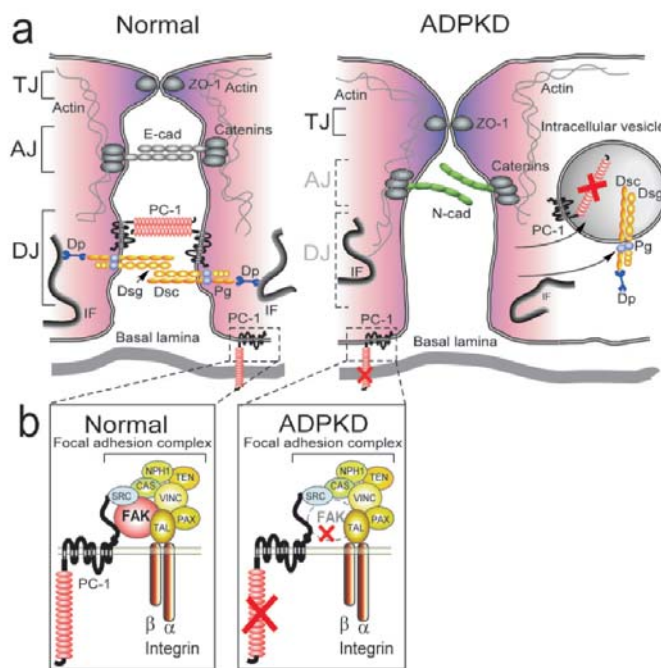


Abb. 1.7: Polycystin-1 in Zell-Zell-Verbindungen und Zell-Matrix-Adhäsion

A) Polycystin-1 (PC-1) ist in Zell-Zell-Adhäsion involviert und lokalisiert in Desmosomen (DJ: desmosomal junction) und Adhärenzverbindungen (AJ: adherens junctions). In ADPKD-Epithelzellen fehlen die Desmosomen-Proteine Desmoglein-1 (Dsg), Desmocollin-2 & -3 (Dsc) und Desmoplakin (Dp) in den Zell-Zell-Kontakten. E-Cadherin (E-cad) fehlt ebenfalls und wird teilweise durch N-Cadherin (N-cad) ersetzt.

B) In normalen Zellen wird PC-1 in fokalen Adhäsionskontakte gefunden in einem Komplex mit Talin (TAL), Paxillin (PAX), Vinculin (VINC), fokaler Adhäsions-Kinase (FAK), c-src (SRC), p130-Cas (CAS), Nephrin (NPH) und Tensin (TEN). In ADPKD-Epithelzellen fehlt FAK in dem Komplex. TJ: tight junction (engl: „dichte Verbindung“), Pg: Plakoglobin, Catenins: α -, β -, γ -Catenin (Bild aus: Ibraghimov-Beskrovnaya und Bukanov, 2008)

2.4.2 ADPKD Typ II

Mutationen im PKD2-Gen sind für ADPKD Typ II verantwortlich und treten in 10 bis 15 Prozent aller ADPKD-Fälle auf. Das Gen umfasst nur 15 Exons. Ein Transkript von fünf kb wird gebildet, das für ein Membranprotein von 968 Aminosäuren, genannt Polycystin-2 (PC-2), kodiert [Mochizuki et al., 1996].

Polycystin-2 ist ein nicht-selektiver Kationen-Kanal, der Calciumströme vermitteln kann [Koulen et al., 2002; González-Perrett et al., 2001]. Vermutlich ist Polycystin-2 in den gleichen ziliären Mechanotransduktionswegen wie Polycystin-1 involviert [Nauli et al., 2003]. Zudem wurde nachgewiesen, dass Polycystin-2 ohne Polycystin-1 im Cytoplasma vorkommt und erst durch letzteres zur Membran transferiert wird. Auch die Kanalaktivität scheint von der Interaktion mit Polycystin-1 abhängig zu sein [Hanaoka et al., 2000]. Zudem wird eine regulierende Rolle bei der Abspaltung und Translokation des C-Terminus von Polycystin-1 vermutet. Infolge kommt es zur Aktivierung von AP1 und AP1-abhängigen Genen [Chauvet et al., 2004].

2.5 Autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung

Eine der bedeutendsten Nephropathien des Kindesalters ist die autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung, die mit einer Inzidenz von 1:20.000 Lebendgeburten auftritt [Zerres et al., 1998].

Charakterisiert wird die Erkrankung durch eine bilaterale massive Vergrößerung der Nieren, hervorgerufen durch die zystische Erweiterung der distalen Tubuli und der Sammelrohre. Bei der ARPKD liegt zudem obligat eine kongenitale Leberfibrose vor, deren Ausprägung unterschiedlich sein kann, aber mit steigendem Alter zunimmt [Zerres et al., 2003].

Das klinische Bild der ARPKD ist in Abhängigkeit der Veränderungen der beteiligten Organe sehr variabel. In vielen Fällen kommt es zu einer frühen Manifestation und Tod in den ersten Lebenstagen. Etwa die Hälfte der mit ARPKD geborenen Kinder stirbt bereits kurz nach der Geburt aufgrund einer respiratorischen Insuffizienz. Durch die krankhafte Veränderung der Nieren des Embryos kann es bereits im Mutterleib zu einer Niereninsuffizienz kommen, was in einer verminderten Urinbildung und somit einem Mangel an Fruchtwasser resultiert (Oligohydramnie). Dies hat zur Folge, dass die Lungen des Embryos sich nicht korrekt entwickeln [Zerres et al., 1996].

Seit die Mutationsanalyse zur ARPKD-Diagnostik angewendet wird, ist deutlich geworden, dass es viele Fälle gibt, in denen die Krankheit milder verläuft und teilweise auch erst in späteren Alter diagnostiziert wird. Gerade bei der letzteren Gruppe präsentiert sich die Erkrankung oft klinisch mit stärkerer Leber- als Nierenbeteiligung [Adeva et al., 2006]. Die Mortalitätsrate ist im ersten Lebensmonat am höchsten. [Bergmann et al., 2005]

Die häufigsten Symptome bei Patienten, die das Neugeborenenalter überleben, sind eine fortschreitende Niereninsuffizienz, ausgeprägte Hypertonie und portale Hypertension. Häufig werden auch Harnwegsinfektionen und in etwa einen Viertel der Fälle eine Wachstumsretardierung festgestellt [Zerres et al., 1996; Zerres et al., 2003; Bergmann et al., 2005].

2.5.1 Das ARPKD-Gen: PKHD1

Um das ARPKD-verantwortliche Gen zu identifizieren wurden genetische Kopplungsanalysen durchgeführt. 1994 wurde das Gen in der Region 6p21.1-p12 lokalisiert [Mücher et al., 1994; Guay-Woodford et al., 1995]. 2002 gelang es dann zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, das verantwortliche Gen zu identifizieren, es wurde als PKHD1 (Polycystic kidney and hepatic disease 1) bezeichnet. Onuchic et al. [2002] konnten mittels „positional cloning“ das Gen nachweisen, während Ward et al. [2002] das ARPKD-verantwortliche Gen in einer Ratte mit polyzystischen Nieren (PCK Ratte: polycystic kidney) identifizierten und nachweisen konnten, dass bei ARPKD-Patienten Mutationen im orthologen Gen vorliegen.

Das Gen umfasst mindestens 470 kb genomischer DNS und besteht aus 86 Exons. Ein komplexes Muster alternativer Spleißung hat zur Folge, dass mehrere Transkripte mit unterschiedlichen Exon-Kombinationen entstehen [Onuchic et al., 2002]. Das längste Transkript von 16,2 kb umfasst 67 Exons und beinhaltet den längsten durchgehenden Leserahmen, welcher 12,2 kb umfasst und für das Protein Polyduktin [Onuchic et al., 2002] bzw. Fibrocystin [Ward et al., 2002] kodiert.

Bis jetzt wurden 276 verschiedene Mutationen im PKHD1-Gen detektiert (Datenbank der Humangenetik RWTH-Aachen; www.humgen.rwth-aachen). Die Mutationen sind über der gesamten extrazelluläre Bereich verteilt, dagegen konnte bislang nur eine einzige Mutation im cytoplasmatischen Bereich nachgewiesen werden. Ausschließlich die sinnverändernde (missense) Mutation T36M konnte bis jetzt in allen Mutationsstudien und bei nicht verwandten Patienten verschiedener ethnischer Herkunft nachgewiesen werden und ist für etwa 15 bis 20 Prozent der betroffenen Allele verantwortlich [Bergmann et al., 2005]. Beim Großteil der Mutationen handelt es sich um Aminosäureausstausche, und in etwa 45 Prozent aller Fälle handelt es sich um Mutationen, die zu einem frühzeitigen Abbruch des Proteins führen [Bergmann et al., 2003].

Einen Genotyp-Phänotyp-Korrelation kann nur für die Art der Mutation, nicht jedoch für eine bestimmte Genregion gemacht werden. Zwei trunkierende Mutationen führen bei allen Betroffenen zu einem schweren, perinatalen oder neonatalen Phänotyp, während eine Abbruchmutation in Kombination mit einer sinnverändernden Mutation sowohl eine schwere, als auch eine mildere Form der Erkrankung hervorrufen kann [Bergmann et al., 2005]. Die Kombination von zwei Spleißmutationen oder einer Spleißmutation und einer trunkierenden Mutation korreliert ebenfalls mit dem schweren perinatalen Phänotyp [Scharp et al., 2005]. Patienten mit einem Aminosäure-Austausch zeigten in den meisten Fällen eine

klinisch mildere Form der ARPKD, und alle Patienten, die die neonatale Periode überlebt haben, weisen mindestens ein Substitutionsmutation auf [Furu et al., 2003].

2.5.2 Expression des PKHD1-Gens

Mit Hilfe von Northern Blot-Versuchen konnte gezeigt werden, dass PKHD1 besonders stark in der humanen fötalen und adulten Niere exprimiert wird und eine schwächere Expression in Pankreas und Leber vorhanden ist [Onuchic et al., 2002; Ward et al., 2002].

In murinem Gewebe wurde zudem eine schwache Expression in Herz, Magen, Dünndarm, Muskel, Uterus und Plazenta nachgewiesen. Das genauere Expressionsmuster wurde mittels *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen und es wurde gezeigt, dass PKHD1 in der Niere während der Embryonalentwicklung der Maus im Mesonephros (E12,5) und in der Ureterknospe exprimiert wird. In der postnatalen Niere ist eine starke Expression in den Sammelrohren vorhanden und eine schwächere in proximalen und distalen Tubuli, in den Glomeruli wurde keine Expression gefunden. Auch in anderen Organen wird PKHD1 exprimiert und zwar in den sich entwickelnden Gallengängen, in der Muskulatur der großen Gefäße, im embryonalen Lungenmesenchym, in den Pankreasgängen, in der sich entwickelnden Trachea und in der Skelettmuskulatur [Nagasawa et al., 2002].

Hiesberger et al. [2004] haben den Promotor des PKHD1-Gens untersucht und eine Bindungsstelle für Hepatocyte Nuclear Factor (HNF)-1-Transkriptionsfaktoren identifiziert. Die Bindung des HNF-1 α kann die PKHD-1-Expression um das zwölffache steigern, HNF-1 β um das 3,3-fache.

Von besonderem Interesse ist dabei HNF-1 β , denn von diesem Protein wurde bereits nachgewiesen, dass es für den Typ 5 des „maturity onset diabetes of the young“ (MODY5) verantwortlich ist, eine Erkrankung, die mit Nierenzysten assoziiert ist. Zudem sind Mutationen im HNF-1 β -Gen für die glomerulozystische Nierenerkrankung verantwortlich.

Transgene Mäuse, die eine dominant-negative HNF-1 β -Mutante exprimieren, entwickeln Nierenzysten, welche eine erniedrigte PKHD1-Expression zeigen [Hiesberger et al., 2004].

Gresh et al. [2004] konnten durch die Inaktivierung des HNF-1 β -Gens in den Sammelrohren und der Henle-Schleife in Mäusen zeigen, dass PKHD1, UMOD und PKD2 unter direkter Kontrolle des HNF-1 β -Transkriptionsfaktors stehen.

2.5.3 Polyduktin

Der längste durchgehende Leserahmen kodiert für ein 4074 Aminosäuren großes Protein, Polyduktin [Onuchic et al., 2002] oder auch Fibrocystin genannt [Ward et al., 2002]. Um Hinweise über die Struktur sowie über mögliche Funktionen des Proteins zu erhalten, wurde eine Vorhersage der Struktur und eine vergleichende Motivsuche mit Hilfe des Computerprogramms SMART (simple modulat architecture research tool) durchgeführt [Onuchic et al., 2002]. Eine schematische Zeichnung des Proteins aufgrund dieser Strukturanalysen ist in Abb. 1.8 dargestellt.

Demnach besitzt Polyduktin eine Transmembrandomäne, welche das Protein in einen großen extrazellulären aminoterminalen Bereich und einen kleinen cytoplasmatischen carboxyterminalen Bereich unterteilt. Durch alternative Spleißung entstehen verschiedene Polypeptide, die in zwei Gruppen eingeteilt werden können; solche mit einer Transmembrandomäne und solche ohne diese Domäne, welche demnach sezerniert werden [Onuchic et al., 2002].

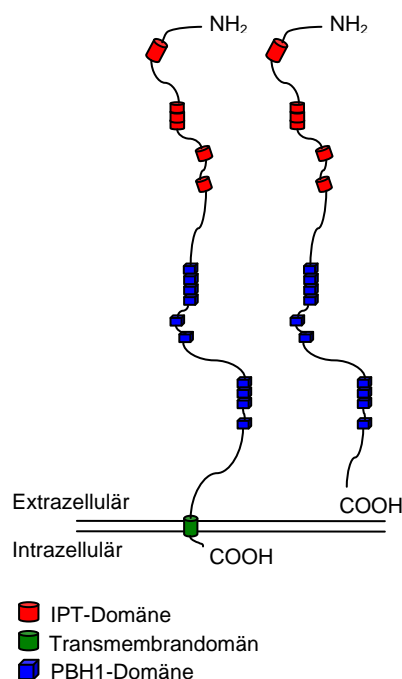


Abb. 1.8: Struktur des humanen Polyduktin

Polyduktin besitzt eine Transmembrandomäne, welche das Protein in einen großen extrazellulären Aminoterminus und einen kleinen cytoplasmatischen Carboxyterminus unterteilt. Die Suche nach funktionellen Domänen ergab sechs IPT-Domänen im extrazellulären Bereich, welche auch in membranständigen Rezeptorproteinen vorkommen. Zudem befinden sich im extrazellulären Bereich ebenfalls zehn PBH1-Domänen. Diese sind bekannt aus Polysaccharidase, wo sie eine ligandenbindende und katalytische Funktion übernehmen. Durch alternative Spleißung entstehen mehrere Polypeptide, die in zwei Gruppen unterteilt werden können. Die erste Gruppe behält eine Transmembrandomäne, während die zweite Gruppe ohne diese Domäne lösliche Peptide enthält.

Im extrazellulären Bereich befinden sich sechs IPT (immunoglobulin like fold shared by plexin transcription factor)-Domänen. Diese Domänen, deren Funktion noch unbekannt ist, kommen bei zwei verschiedenen Gruppen von Proteinen vor. Die erste Gruppe umfasst

Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel die Rel-Familie, die jeweils eine IPT-Domäne aufweisen. Die zweite Gruppe umfasst membranständige Rezeptorproteine, die häufig zur Sema-Superfamilie gehören, wie den Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (HGFR: hepatocyte growth factor receptor) und die Familie der Plexine, welche an der Regulation der zellulären Proliferation und Verankerung beteiligt sind. Alle Rezeptorproteine dieser Gruppe weisen mehrere IPT-Domänen auf. Aufgrund seiner Transmembrandomäne, sowie des Vorhandenseins mehrerer IPT-Domänen, könnte Polyduktin zur der zweiten Gruppe gehören und möglicherweise die Funktion eines Rezeptors übernehmen [Onuchic et al., 2002].

Als weitere funktionelle Domänen wurden Parallele-beta-Helix 1 (PbH1)-Domänen identifiziert. Diese befinden sich zwischen der letzten IPT-Domäne und der Transmembrandomäne. PbH1-Domänen sind von bakteriellen Polysaccharidasen bekannt, wo sie für die Ligandenbindung und katalytische Reaktionen wichtig sind [Onuchic et al., 2002].

Das PROSITE-Computerprogramm findet noch ein drittes wichtiges Motiv, eine Arginin-Glycin-Aspartat-(RGD)-Domäne, welche bereits in verschiedenen Proteinen gefunden wurde, die eine Rolle bei der Zelladhäsion spielen [Onuchic et al., 2002].

Der extrazelluläre Bereich weist potentielle Glycosylierungsstellen auf, während der intrazelluläre Bereich vier mögliche Phosphorylierungsstellen aufweist, eine für Proteinkinase A (PKA) und drei für PKC [Ward et al., 2002].

Zhang et al. [2004] zeigten auf murinem Gewebe, dass Polyduktin in der Ureterknospe und den Mesonephros-Tubuli vorkommt und im adulten Gewebe hauptsächlich in den Sammelrohren und im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife exprimiert wird. Das Protein ist dabei hauptsächlich in der apikalen Membran lokalisiert. Ward et al. [2003] zeigten mit humanem Gewebe, dass in embryonalem Gewebe ein starkes Signal in den Ureterknospen und den Sammelrohren vorhanden war und ein schwächeres Signal im sich noch entwickelnden Nephron. Dagegen konnte in infantilem Nierengewebe nur in den Sammelrohren und der Henle-Schleifen ein Signal detektiert werden; im adulten Gewebe reduzierte sich dieses hauptsächlich auf die Sammelrohre. Zudem war Polyduktin in den sich entwickelnden und ausgereiften Gallengängen der Leber, im Pankreas und in Testis nachweisbar. Auch in humanem Gewebe war eine erhöhte Expression des Proteins in der apikalen Membran zu erkennen. Polyduktinexpression in den Sammelrohren und der Henle-Schleife von adultem Nierengewebe konnte von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt werden, ebenso die Expression im Pankreas und in den Gallengängen der Leber [Menezes et al., 2004].

Mehrere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass Polyduktin in den primären Zilien kultivierter Nierenzellen [Ward et al, 2003; Zhang et al., 2004; Menezes et al., 2004; Wang et al., 2004] und Cholangiozyten [Masyuk et al., 2003] vorkommt. Wang et al. [2004] konnten zudem zeigen, dass Polyduktin in murinem und humanem Gewebe ebenfalls in den Zilien lokalisiert ist. Polyduktin ist jedoch nicht ausschließlich im Zilium lokalisiert, sondern auch in der gesamten Zellmembran nachweisbar, wo es mit E-Cadherin kolokalisiert [Wang et al., 2007]. Da mehrere Proteine, die in zystische Nierenerkrankungen mutiert sind, in Zilien lokalisiert sind und teilweise miteinander interagieren oder wenigstens im gleichen Proteinkomplex vorliegen, lag die Vermutung nahe, dass dies auch auf Polyduktin zutreffen könnte. (Eine Übersicht der Proteine, die für polyzystische Nierenerkrankungen verantwortlich sind und deren Lokalisation und vermutete Assoziation in Proteinkomplexe sind in Abb. 1.9 dargestellt).

Eine Kolokalisation von Polyduktin und Polycystin-2 ist naheliegend, da beide Proteine mit E-Cadherin kolokalisieren. In Immunpräzipitationsversuchen in kultivierten Zellen wurde eine schwache Interaktion beider Proteine nachgewiesen, die jedoch in Hefe-zwei-Hybrid-Versuchen mit verschiedenen Mutanten nicht bestätigt werden konnte. Ob diese Interaktion direkt ist, oder eher von einem anderen Protein vermittelt wird, bleibt ungeklärt. So wurde eine Interaktion mit Kif3a, einer Motoruntereinheit von Kinesin-2, im gleichen Experiment nachgewiesen [Wang et al., 2007], und Wu et al. [2006] zeigten, dass der carboxyterminale Bereich von Polyduktin und Polycystin-2 nicht direkt miteinander interagieren, sondern nur im selben Komplex vorliegen, wenn Kif3b ebenfalls vorhanden ist. Dagegen konnten Kim et al. [2008] den Carboxy-Terminus von Polyduktin mit dem Amino-Terminus von Polycystin-2 kopräzipitieren. Es bleibt abzuwarten ob es sich hierbei um eine direkte Interaktion zwischen beiden Proteinen handelt. Da Polyduktin einen Effekt auf die strömungsinduzierte Calciumantwort hat und somit eventuell auch eine Rolle als Mechanosensor übernimmt, wie auch für Polycystin-1/-2 postuliert wurde, ist eine Interaktion dieser Proteine und ihre Beteiligung an gleichen Signalwegen denkbar [Wang et al., 2007].

Eine weiteres Indiz für eine mögliche Rolle in der Regulation von Calciumreservoirs ist der putative Interaktionspartner CAML (calcium modulating cyclophilin ligand). Dieses Protein spielt eine Rolle in der Regulation des cytosolischen Calciumreservoirs, und eine partielle Kolokalisation, sowie Koimmunopräzipitation beider Proteine in Zellkultur weisen auf ihre mögliche Interaktion hin [Nagano et al., 2005]. Eine Interaktion zwischen Polyduktin und Polycystin-2 wird weiter unterstützt durch die Beobachtung dass die Inhibition von *Pkhd1* die

Symptome der *Pkd2*^{+/-}-Mäuse verschlimmert und zudem die Polycystin-2 Kanalaktivität beeinflusst [Kim et al., 2008].

Vor Kurzem wurde gezeigt, dass Polyduktin proteolytisch gespalten wird, wobei der größte Teil des extrazellulären Bereichs vermutlich an einer Proprotein-Convertase-Stelle gespalten wird und über Schwefelbrücken mit dem noch in der Membran verankerten C-terminalen Teil des Proteins verbunden bleibt. Aktivierung bestimmter Metalloproteinasen hat dann zur Folge, dass der extrazelluläre Anteil ins Lumen sezerniert wird. Eine γ -Secretase-abhängige Abspaltung des intrazellulären Bereichs scheint gleichzeitig statt zu finden. Erste Versuchsergebnisse deuten darauf hin, dass der intrazelluläre Teil von Polyduktin nach Freisetzung in den Nukleus transloziert [Kaimori et al., 2007; Hiesberger et al., 2006]. Diese Beobachtungen implizieren, dass Polyduktin die Transkription von Genen beeinflusst. Die tatsächliche Funktion des Proteins bleibt dennoch vorerst ungeklärt.

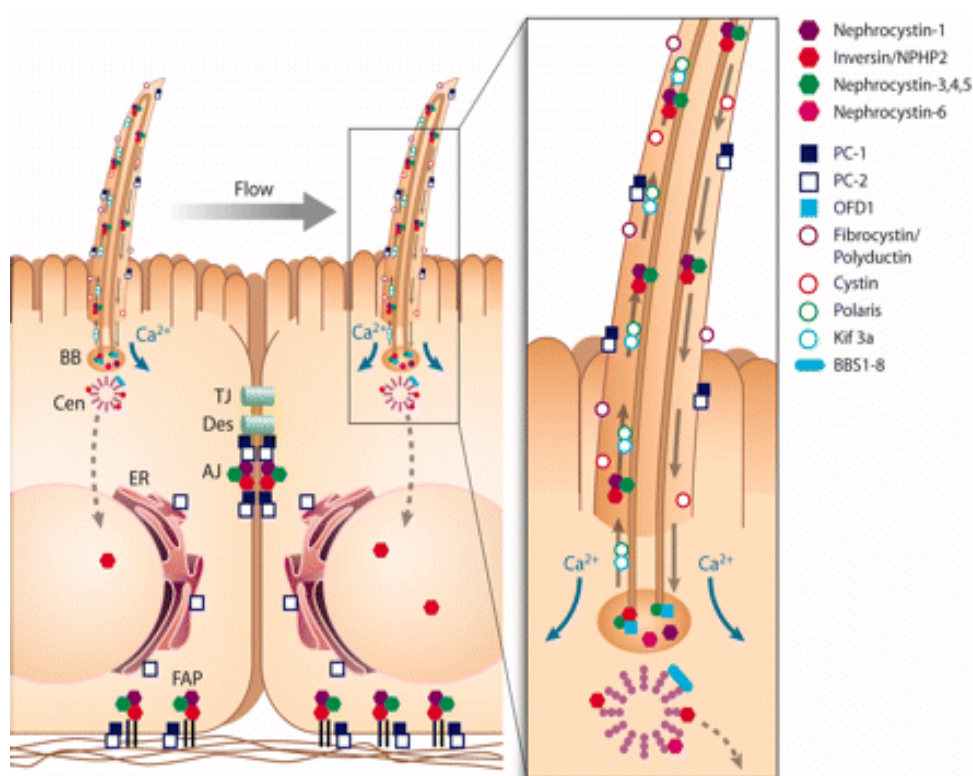


Abb. 1.9: Schematische Darstellung der Lokalisation von in polyzystischen Nierenerkrankungen involvierten Proteinen

Viele der Proteine, die in polyzystischen Nierenerkrankungen mutiert sind, sind in den Zilien lokalisiert. Für Polycystin-1 (PC-1) und -2 (PC-2), sowie für einige Nephrocystin-Proteine und Inversin konnte zudem eine Lokalisation in fokalen Adhäsionskontakten und in Zell-Zell-Verbindungen nachgewiesen werden. Der getüpfelte Pfeil zeigt den Transport entlang des Microtubuli-Systems, welcher von Kinesin-2 vermittelt wird. AJ: Adhärenzverbindung (adherens junction); BB: Basalkörper (basal body); Cen: Zentriol (centriole); ER: endoplasmatische Reticulum; FAP: fokale Adhäsions Punkt; TJ: tight junction (Bild aus: Hildebrandt und Zhou, 2007)

2.5.4 Tiermodelle

Es existieren diverse Tiermodelle für ARPKD, die zum Verständnis dieser Erkrankung und zur Funktion von Polyduktin beigetragen haben. Einige Tiermodelle sind durch eine spontane Mutation entstanden und zeigen einen Phänotyp, der in Bezug zur Morphologie, Ort der Zystenentstehung, extrarenalen Manifestation und Progression der Erkrankung ARPKD entsprechen. Hierzu gehört die PCK-Ratte, die eine spontane Spleißmutation im PKHD1-orthologen Gen trägt [Ward et al., 2002]. Diese Ratte zeigt polyzystische Veränderungen in der Niere, erweiterte Gallengänge, eine kongenitale Fibrose in der Leber und Cholangiozyten mit kurzen missgebildeten Zilien, die kein Polyduktin exprimieren [Sanzen et al., 2001; Masyuk et al., 2003].

Ein sehr gut charakterisiertes ARPKD-Mausmodell ist die *cpk* (congenital polycystic kidney)-Maus. Diese Maus trägt eine Deletionsmutation, welche für ein trunkiertes Cystin kodiert, ebenfalls ein Zilienprotein [Hou et al., 2002]. In den Nieren sind, wie bei der humanen ARPKD, Zysten in den Sammelrohren ersichtlich. Der Leberphänotyp sieht ebenfalls dem der ARPKD ähnlich, indem die Mäuse eine kongenitale Leberfibrose entwickeln [Avner et al., 1987; Mrug et al., 2008].

Zwei weitere Mausmodelle sind die *bpk* (BALB/c polycystic kidneys)-Maus, und die *orpk* (oak ridge polycystic kidneys)-Maus. Sowohl die *bpk*-Maus als auch die *orpk*-Maus zeigen Zysten in den proximalen Tubuli und den Sammelrohren, aber nicht in der Leber [Nauta et al., 1993; Yoder et al., 1995].

Nachdem es Nagasawa et al. [2002] gelang das orthologe PKHD1-Gen der Maus zu identifizieren besteht nun die Möglichkeit, gezielt Mausmodelle zu erstellen, die Mutationen im *Pkhd1*-Gen tragen. Das erste Mausmodell, *Pkhd1^{ex40}* exprimiert ein modifiziertes Transkript, bei dem das Exon 40 übersprungen wird. Diese Mäuse entwickeln schwerwiegende Missbildungen der Lebergallengänge. In Gegensatz zu humanen Patienten zeigen die Mäuse jedoch keinen Nierenphänotyp [Moser et al., 2005].

In der *Pkhd1^{del2/del2}*-Maus wurde das Exon 2 deletiert [Woollard et al., 2007]. Da sich in diesem Exon das Startcodon befindet, ist zu erwarten, dass kein Polyduktin gebildet wird. Ein alternatives Startsignal kann jedoch nicht komplett ausgeschlossen werden. Die Mäuse zeigen eine zystische Leber und in etwa der Hälfte der Fälle ebenfalls Zysten im Pankreas. Nur die Weibchen entwickeln einen Nierephänotyp und dies erst im Alter von neun Monaten (bzw. drei Monaten in zurückgekreuzten Mäusen). Bei diesen Weibchen wurde eine zystische Erweiterung der proximalen Tubuli beobachtet.

Ein weiteres Mausmodell wurde entwickelt, indem man die Exone 1 bis 3 durch ein LacZ-Gen ersetzte [Williams et al., 2008]. Da dieses ein Stopcodon am Ende der LacZ-Kassette trägt, wird kein Polyduktin exprimiert. Ab einem Alter von 45 Tage, zeigten diese *Pkhd1*^{LacZ/LacZ}-Mäuse Zystenentwicklung in den proximalen Tubuli, den Sammelrohren und den Glomeruli. Zudem entwickelten die Mäuse eine Leberfibrose und in manchen Fällen Zysten im Pankreas bzw. in der Harnblase. Interessanterweise wiesen die Mäuse eine erniedrigte Expression von Polycystin-1 und Polycystin-2 auf, was eine weiterer Hinweis dafür ist, dass Polyduktin, Polycystin-1 und -2 miteinander assoziiert sind.

Kim et al. [2008] deletierten das 16. Exon des murinen *Pkhd1*-Gens und setzten im 15. Exon ein GFP-Reporter-gen ein. Die *Pkhd1*^{-/-}-Mäuse zeigten sowohl Zystenbildung in den Nieren als auch in der Leber, wobei der Leberphänotyp stärker ausgeprägt war und mit einer Fibrose einher ging. Im Pankreas waren die kleinen und großen Pankreasgänge erweitert. In manchen Mäusen manifestierte sich die Erkrankung bereits früh, während andere Mäuse über ein Jahr überlebten und späte Symptome zeigten. Homozygote Mäuse zeigten eine erniedrigte Zahl an Zilien in der Niere, außerdem waren die vorhandenen Zilien bedeutend kleiner als im Wildtyp. In den Mäusen war die Expression von Polycystin-2 erniedrigt. Kreuzung mit *Pkd2*^{+/-}-Mäuse ergab, dass die fehlende Polyduktinexpression einen stärkeren Phänotyp in den *Pkd*-Mäusen hervorrief. Fehlendes Polyduktin scheint die Kanalaktivität von Polycystin-2 zu inhibieren.

Gallagher et al. [2008] deletierten das Exon 4 in *Pkhd1*, was zu einer Deletion von 66 Codons führte. Das exprimierte mutierte Polyduktin zeigt Expressionslevels von etwa 30 Prozent im Vergleich zu Wildtyp Polyduktin. *Pkhd1*^{del4/del4}-Mäuse entwickeln eine Leberfibrose und bilden Zysten in der Leber. Trotz dieses Leberphänotyps scheint die Leberfunktion nicht beeinträchtigt zu sein. Weiterhin wurde gezeigt, dass es bei den *Pkhd1*^{del4/del4}-Mäusen zu einer Erweiterung der Pankreasgänge kommt und etwa 10 Prozent der Mäuse Zysten im Pankreas entwickelten. Einen Nierenphänotyp entwickelten diese Mäuse bis zu einem Alter von zwölf Monaten nicht.

3. Zielsetzung

Trotz seiner kausalen Involvierung in ARPKD ist die biologische Funktion von Polyduktin bislang unbekannt. Eindeutige Homologien zu bekannten Proteinen bestehen nicht, so dass es bislang keine konkrete Vorstellung darüber gibt, wie Mutationen im PKHD1-Gen zur Entstehung der Nieren- und Leberpathologie führen. Im intrazellulären Bereich des Proteins sind potentielle Phosphorylierungsstellen vorhanden, die eine Rolle bei der intrazellulären Weiterleitung von Signalen spielen könnten. Dem C-Terminus kommt zudem noch eine besondere Bedeutung zu, da er durch proteolytische Spaltung freigesetzt wird und in den Nukleus transloziert [Kaimori et al., 2007; Hiesberger et al., 2006]. Diese Beobachtung ist ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung des C-Terminus an Signaltransduktionsprozessen. Dies wiederum legt die Vermutung nahe, dass der Polyduktin C-Terminus mit anderen Proteinen interagiert. Bislang konnte jedoch nur ein putativer Interaktionspartner von Polyduktin, CAML, identifiziert werden [Nagano et al., 2005].

Ziel dieser Arbeit ist es Interaktionspartner von Polyduktin zu identifizieren und somit einen Hinweis auf seine biologische Funktion zu erlangen. Hierzu sollte mit dem cytoplasmatischen Teil von Polyduktin ein Hefe-zwei-Hybrid Interaktions-Screen durchgeführt werden.

Für die Durchführung einen Hefe-zwei-Hybrid-Screens stehen verschiedene Systeme zur Verfügung. Eines davon ist das „SOS recruitment system“. Dieses ist besonders für Membranproteine geeignet, da das Köderprotein membrangebunden ist. Wegen einer hohen Autoaktivierung des Polyduktin-C-Terminus in diesem System konnten keine potentiellen Interaktionspartner identifiziert werden. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass der C-Terminus von Polyduktin seine Funktion erst entfaltet, nachdem er proteolytisch abgespalten und zum Nukleus transloziert ist, könnte ein System, bei dem die Interaktion im Nukleus abläuft, von Vorteil sein. Aus diesem Grund wurde das GAL4-System gewählt, welches auf dem *S. cerevisiae* Transkriptionsfaktor GAL4 beruht.

Nach Herstellung des Köderkonstrukts wurde ein Hefe-zwei-Hybrid-Screen mit einer humanen fötalen Nieren-cDNS-Bibliothek durchgeführt. Nach der Detektion potentieller Interaktionspartner sollten diese durch Sequenzierung und anschließenden Datenbankvergleich identifiziert werden und ihre Interaktion durch einen weiteren *in vivo* Test bestätigt werden. Es sollten zunächst die am interessantesten putativen Interaktionspartner genauer analysiert werden. Hierzu gehören das Eingrenzen der Interaktionsoberfläche durch Herstellung von Proteinmutanten, die Verifikation der Interaktion mittels GST-Proteininteraktionsstudien und Untersuchungen an Gewebe von ARPKD-Patienten.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien hatten den Reinheitsgrad p. A.

2-Propanol	Merck, Darmstadt
3-(N-Morpholin)-Propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, München
5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- α -D-Galactopyranosid (X- α -Gal)	Clontech, St.-Germain-en-Laye (FR)
5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid (X-Gal)	Roth, Karlsruhe
Aceton	Fluka, Neu-Ulm
Acrylamid-Bisacrylamid-Fertiglösung 30 %	Roth, Karlsruhe
Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Sigma-Aldrich, München
Aluminiumkaliumsulfat ($KAl(SO_4)_2 \times 12 H_2O$)	Merck, Darmstadt
Aminosäure Zusatz -Leu	Bio 101, La Jolla (USA)
Aminosäure Zusatz -Trp	Bio 101, La Jolla (USA)
Aminosäure Zusatz -Leu-Trp	Bio 101, La Jolla (USA)
Aminosäure Zusatz -His-Leu-Trp	Bio 101, La Jolla (USA)
Aminosäure Zusatz -Ade-His-Leu-Trp	Bio 101, La Jolla (USA)
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Aquatex	Merck, Darmstadt
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Merck, Darmstadt
Chloralhydrat ($C_2H_3Cl_3O_2$)	Merck, Darmstadt
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
Citronensäure ($C_6H_8O_7$)	Merck, Darmstadt

Complete mini (Protease-Inhibitoren-Cocktail)	Roche, Penzberg
Coomassie "SimplyBlue"	Invitrogen, Karlsruhe
"Dako REAL Antibody Diluent"	Dako, Hamburg
Desoxy-Nucleotridtriphosphat (dNTPs)	GeneCraft, Köln
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
Eosin	Merck, Darmstadt
Essigsäure (CH_3COOH)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Fluka, Neu-Ulm
Glutathione Sepharose 4B	Amersham Bioscience, Freiburg
Glycerol	VWR, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich, München
Hämatoxylin	Fluka, Neu-Ulm
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hefe-Extrakt	Merck, Darmstadt
Hepes	Serva, Heidelberg
Hering-Hoden-DNS	BD Bioscience, Heidelberg
Isopropyl-1-thio- β -D-Galaktopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat ($C_2H_3KO_2$)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Ligasepuffer (10x)	New England Biolabs, Schwalbach
Lithiumacetat ($C_2H_3LiO_2$)	Sigma-Aldrich, München
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat ($MgSO_4$)	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Minimalmedium (SD Base)	Clontech, St.-Germain-en-Laye (FR)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt

Natriumiodat (NaJO ₃)	Merck, Darmstadt
NP-40 (Igepal)	Sigma-Aldrich, München
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	BioRad Life Science, München
N,N-Dimethylformamide	Sigma-Aldrich, München
Natriumacetat (NaOAc)	Applied Biosystems, Warrington (UK)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat-Dihydrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Natronlauge (NaOH) 1 N und 5 N	Merck, Darmstadt
Oligodesoxynukleotide	Sigma-Aldrich, München
o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid (ONPG)	Sigma-Aldrich, München
Paraplast plus	McCormick Scientific, St. Louis (USA)
PBS-Tabletten	Sigma-Aldrich, München
PCR-Puffer (10x) und MgCl ₂ -Lösung (50 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Pepton	Merck, Darmstadt
“Peroxidase-Blocking Solution”, Dako REAL	Dako, Hamburg
Pertex 3000	Medite, Burgdorf
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglycol (PEG) 3350 und 8000	Sigma-Aldrich, München
Proteinladepuffer (Roti-Load)	Roth, Karlsruhe
Puffer für Restriktionsendonucleasen	New England Biolabs, Schwalbach
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
Salzsäure (HCl) 1 N und 4 N	Fluka, Neu-Ulm
„Shrimp alkaline phosphatase” (SAP) Puffer (10x)	Roche, Mannheim
Stickstoff flüssig	Linde, Pullach
Tissue Tek O.C.T. Compound	Sakura, Heppenheim
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Triton X 100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
Trypton	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt
YPD Medium	Clontech, St.-Germain-en-Laye (FR)

1.2 Verbrauchsmaterialien

96-Loch-Mikrotiterplatten	Brand, Wertheim
Blaukappenröhrchen, 15 ml und 50 ml	Greiner Labortechnik, Solingen
Dako Pen S2002	Dako, Hamburg
Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Köningshofen
Einbettkassetten	NeoLab, Woburn (UK)
Einmalspritzen 5 ml Omnifix	B. Braun, Sheffield (UK)
Glaskügelchen, Säure gewaschen (425-600 µm)	Sigma-Aldrich, München
Halbmikroküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Kapillarspalt-Objektträger	Dako, Hamburg
Mikrotom-Klingen A35	Feather, Osaka (JP)
Objektträger Histobond	Marienfeld, Lauda-Köningshofen
Paraffinkassetten Tissue Tek uni cassette	Sakura, Heppenheim
Parafilm M	Pechiney plastic packaging, Chicago (USA)
Pasteurpipetten, Glas-	Brand, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße 200 µl	Axygen Scientific, Union City (USA)
Petrischalen 10 cm und 15 cm	Greiner Labortechnik, Solingen
Pipettenspitzen, 10 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, 100 und 1000 µl	Greiner Labortechnik, Solingen
Pipettenspitzen, Filter tip 10, 100, 1000 µl	Axygen Scientific, Union City (USA)
PVDF-Membran	Millipore, Eschborn
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme BioMax Light Film	Kodak, Rochester (USA)
Skalpelle, Einweg-	Feather, Osaka (JP)
Sterilfilter 0,2 µm	Nalgene, Neerijse (BE)
Whatmann # 5 Rundfilter	Schleicher und Schuell, Dassel
Whatmann 3 mm Filterpaper	Schleicher und Schuell, Dassel

1.3 Kits

BD Yeastmaker Yeast Transformation System 2	Clontech, St.-Germain-en-Laye (FR)
Big Dye Terminator v1.1 Cycle sequencing kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Dako REAL Buffer Kit	Dako, Hamburg
Dako REAL Detection Systems (LSAB+) HRP/AEC Mouse/Rabbit	Dako, Hamburg
ECL plus western blotting detection system	GE Healthcare, Chalfont St. Giles (UK)
Matchmaker GAL4 Two Hybrid System 3	Clontech, St.-Germain-en-Laye (FR)
Nucleobond Megakit	BD Bioscience, Heidelberg
Protein Assay	BioRad Life Science, München
Qiagen HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction kit	Qiagen, Hilden
TnT Quick Coupled Transcription/ Translation Systems	Promega, Mannheim
TOPO TA Cloning Kit (pCRII-TOPO)	Invitrogen, Karlsruhe

1.4 DNS-Größenstandards und Protein-Molekulargewichtsstandard

1 kb Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
100 bp Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
SeeBlue Plus2	Invitrogen, Karlsruhe

1.5 Radiochemikalien

L-[³⁵ S] Methionin 18,5 MBq (0,500 mCi)	Hartmann Analytic, Braunschweig Amersham, Braunschweig
---	---

1.6 Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmide sind im Anhang dargestellt.

pCRII-TOPO

Plasmid für die direkte Klonierung von PCR-Produkten, welche mit einer DNS-Polymerase amplifiziert wurden, die einen A-Überhang synthetisierten. Enthält sowohl ein Ampicillin- als auch ein Kanamycinresistenzgen, einen T7- und einen SP6-Promotor und eine multiple Klonierungsstelle. (Invitrogen, Karlsruhe)

pCL1

Das Plasmid enthält die cDNS für den GAL4-Transkriptionsfaktor unter Kontrolle des GAL1-Promotors. „Matchmaker GAL4 Two Hybrid System 3“ (Clontech, St.-Germain-en-Laye (FR))

pGBKT7

Expressionsplasmid, welches die cDNS, die für AS 1-147 des GAL4-Transkriptionsfaktors (DNS-Bindungsdomäne) und ein cMyc-Epitop kodiert, enthält sowie eine multiple Klonierungsstelle, ein Kanamycin-Resistenzgen und ein Tryptophangen. Expression steht unter Kontrolle des ADH1-Promotors. „Matchmaker GAL4 Two Hybrid System 3“ (Clontech, St.-Germain-en-Laye (FR))

pGBKT7 53

Enthält die cDNS für ein Fusionsprotein aus den Aminosäuren 1-147 des GAL4 Transkriptionsfaktors (DNS-Bindungsdomäne) und den Aminosäuren 72-390 des murinen p53 unter Kontrolle des ADH1-Promotors. „Matchmaker GAL4 Two Hybrid System 3“ (Clontech, St.-Germain-en-Laye (FR))

pGBKT7 Lam

pGBKT7 Lam kodiert für ein Fusionsproteine aus der GAL4 DNS-Bindungsdomäne und die Aminosäuren 66-230 des humanen Lamin C-Proteins. Das Fusionsprotein steht unter Kontrolle des ADH1-Promotors. „Matchmaker GAL4 Two Hybrid System 3“ (Clontech, St.-Germain-en-Laye (FR))

pGADT7

Expressionsplasmid, welches die cDNS für AS 768-881 des GAL4-Transkriptionsfaktors (Aktivierungsdomäne) und ein HA-Epitop enthält, das unter Kontrolle des ADH1-Promotors steht, sowie ein Ampicillin-Resistenzgen und ein Leucingen. Dieses Plasmid ist abgesehen von der multiple Klonierungsstelle, identisch mit dem pACT2-Plasmid, in dem sich der cDNS-Bibliothek befindet. „Matchmaker GAL4 Two Hybrid System 3“ (Clontech, St.-Germain-en-Laye (FR))

pGADT7 T

Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus der GAL4-Aktivierungsdomäne und den AS 84-708 des SV40 “Large-T”-Antigen unter Kontrolle des ADH1-Promotors. „Matchmaker GAL4 Two Hybrid System 3“ (Clontech, St.-Germain-en-Laye (FR))

pGEX-4T1- c-Term PKHD1

Prokaryotisches Expressionsplasmid, welches die cDNS für ein Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase und dem C-terminale Aminosäure 3880-4074 von humanem Polyduktin kodiert. Das Fusionsprotein steht unter Kontrolle des tac-Promotors. Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Frau Dr. J. Kirfel, Institut für Pathologie, Universitätskliniken Bonn, zur Verfügung gestellt.

pDNR-UMOD

Dieses Plasmid enthält die komplette humane cDNS von UMOD, flankiert von LoxP-Sequenzen, sowie einen T7-Polymerase-Promotor, ein Chloramphenicol-Resistenzgen, und das Sucrasegen aus *B. subtilis*. RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (Berlin), Klon: IRAUp969G0689D6

pCMV-C7

Dieses Plasmid enthält die komplette humane cDNS des Komplement Komponent-7 (C7) im pCMV-SPORT6-Plasmid und steht somit unter Kontrolle des CMV-Promotors. RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (Berlin), Klon: IRATp970E0794D6

pCRII-OFD1

Die komplette humane cDNS von OFD1 befindet sich in dem Plasmid pCR-BluntII-TOPO. Zusätzlich besitzt das Plasmid Resistenzgene für Kanamycin und Ampicillin. RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (Berlin), Klon: IRAMp995O172Q2

pBSR-NPR1

Dieses Plasmid enthält die komplette humane cDNS von NPR1. Es wurde in das Plasmid pBluescriptR einkloniert. RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (Berlin), Klon: IRAKp961A12133Q2

pCMX-PL2 [Umesono et al., 1991]

Eukaryontisches Expressionsplasmid, welches einen CMV- und T7-Promotor enthält. Freundlicherweise von Frau Dr. J. Kirfel, Institut für Pathologie, Universitätskliniken Bonn zur Verfügung gestellt.

pCMX-Flag

pCMX-Vektor, welcher ein Flag-Epitop enthält. Von Frau Dr. J. Kirfel, Institut für Pathologie, Universitätskliniken Bonn, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

pGEX-4T2

Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Frau Dr. U. Schepers, Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn, zur Verfügung gestellt. Es enthält die Glutathion-S-Transferase cDNS gefolgt von einer multiplen Klonierungsstelle. Das Plasmid steht unter Kontrolle des tac-Promotors.

1.7 Verwendete Organismen und cDNS-Bibliothek

1.7.1 *E. coli*-Stämme

TOP10 F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139*
\Delta(*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rspL* (Str^R) *endA1* *nupG*

BNN132	endA1, gyr96, hsdR17, supE44, relA1, $\Delta(\text{lac-proAB})$ (F' traD36 proA+ proB+ lacIq $\Delta(\text{lacZ})$ M15) $\Delta\text{KC(kan-cre)}$
BL21pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_b (r_b⁻m_b⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^r)
Origami	$\Delta(\text{ara-leu})$ 7697 ΔLacX74 ΔPhoA <i>PvuII</i> <i>PhoR</i> <i>araD</i> 139 <i>ahpC galE galK rpsL</i> F' [<i>lac⁺lacI^q</i>] <i>pro</i>] <i>gor522</i> : : Tn10 <i>trxB</i> (Kan ^r , Str ^r , Tet ^r) ⁴
Rosetta gami	$\Delta(\text{ara-leu})$ 7697 ΔLacX74 ΔPhoA <i>PvuII</i> <i>PhoR</i> <i>araD</i> 139 <i>ahpC galE galK rpsL</i> F' (<i>lac⁺lacI^qpro</i>) <i>gor522</i> : : Tn10 <i>trxB</i> pRARA ² (Cam ^r , Kan ^r , Str ^r , Tet ^r) ⁴

1.7.2 *S. cerevisiae*-Stamm

AH109	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2 : : GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -HIS3, GAL2 _{UAS} -GAL2 _{TATA} -ADE2, URA3 : : MEL1 _{UAS} -MEL1 _{TATA} -lacZ
-------	--

1.7.3 cDNS-Bibliothek

Zur Durchführung des Hefe-zwei-Hybrid-Screens wurde eine humane fötale Nieren cDNS-Bibliothek der Firma Clontech (St.-Germain-en-Laye (FR)) verwendet. Dafür wurde die Gesamt-RNS aus Nieren von männlichen und weiblichen kaukasischen Föten im Alter zwischen 21 bis 30 Wochen verwendet.

Die cDNS-Fragmente wurden über *XhoI/EcoRI* in ein pACT2-Plasmid kloniert. Die durchschnittliche Länge der Fragmente beträgt 1,9 kb. Die Bibliothek besteht aus 3,5 x 10⁶ unabhängigen Klonen.

1.8 Enzyme

Restriktionsendonucleasen	New England Biolabs, Schwalbach
RNase A	Sigma-Aldrich, München
“Shrimp alkaline phosphatase” (SAP)	Roche, Mannheim
T4-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
Taq DNS Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe

1.9 Oligonukleotide

Synthetische Desoxynukleotide stammen von der Firma Sigma-Aldrich, München

1.9.1 Oligonukleotide zur Klonierung des C-Terminus von Polyduktin

PKHD1-c-for	5'-TGCCGAATTCTGGCTTAAAAGAAGCAAAAGCAGA-3'
PKHD1-c-rev	5'-CGTAGGATCCTCACAGTTGCTCCTGAATAGTTTG-3'

1.9.2 Oligonukleotide zur Amplifizierung von cDNS-Fragmenten aus der Bibliothek

5'AD LD Insert	5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC-3'
3'AD LD Insert	5'-GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGAT-3'

1.9.3 Oligonukleotide zur Klonierung der OFD1-Mutanten und der vollständigen cDNS

OFD1 ApaI 1 for	5'-GTTGGGCCCTTATGATGGCGCAGTCCAACATG-3'
OFD1 AS 560 for	5'-CCGAATTCGGAATCCAAAGCAGTCTGTGATCG-3'
OFD1 AS 705 for	5'-CCGAATTCGGGGGCACACTTGAAGAAAGGAATG-3'
OFD1 AS 797 for	5'-CCGAATTCGGCTTTATCGAAGACAAACTGAACTT-3'
OFD1 AS 956 rev	5'-GGTTAATTAAATTTTCACTGTGAGCAGATTTGTC-3'
OFD1 AS 1012 rev	5'-GGTTAATTAACCAAGAGTCGTCTAGTTCTTCA-3'

1.9.4 Oligonukleotide zur Klonierung der NPR1-Mutanten

NPR1 AS 705 for	5'-CCGAATTCGGGAGCTCCTGCGAATGGCTT-3'
NPR1 AS 763 for	5'-CCGAATTCGGTTCCGGCCCTCCCTGGCC-3'
NPR1 AS 985 for	5'-CCGAATTCGGGTGGGACTGAAGATGCCCCG-3'
NPR1 AS 1010 rev	5'-GGCTCGAGTTCCCCATTAGACTCCATTCTTG-3'
NPR1 AS 1061 rev	5'-GGCTCGAGGCCTCGGGTGCTACTCCCC-3'

1.9.5 Oligonukleotide zur Klonierung der C7-Mutante und der vollständigen cDNS

C7 AS 1 for	5'-CGGTTAATTAAGATGAAGGTGATAAGCTTATTCATTT-3'
C7 AS 335 for	5'-CGGTTAATTAAGAAGAAATGTAAATCCTCAGGTTGG-3'
C7 AS 843 rev	5'-GGCTCGAGCTACTGGGTTTCCGCAGCAC-3'

1.9.6 Oligonukleotide zur Klonierung der Uromodulin-Mutanten und der vollständigen cDNS

UMOD AS 1 for	5'-CCGAATTCGGATGGGGCAGCCATCTCTGAC-3'
UMOD AS 158 for	5'-CCGAATTCGGGGGTTGGACTGCGTGCCCG-3'
UMOD AS 298 for	5'-CCGAATTCGGGAGGAGTGCAGTATAGACGAG-3'
UMOD AS 419 for	5'-CCGAATTCGGATCAAAATCAACTTTGCATGCTCC-3'
UMOD AS 444 rev	5'-GGCTCGAGACTGACCATTGGCTGTAGGGC-3'
UMOD AS 557 rev	5'-GGCTCGAGTCCAGCAAACCGGAACATCTG-3'
UMOD AS 640 rev	5'-GGCTCGAGCTGAAAAGTCAGGGTCAAGGTG-3'

1.9.7 Oligonukleotide zur Einführung von Restriktionsstellen und des Myc-Epitops

EcoRI-PacI-XhoI for	5'-AATTCTTAATTAAC-3'
EcoRI-PacI-XhoI rev	5'-TCGAGTTAATTAAG-3'
EcoRI-PacI-XhoI if for	5'-AATTCGGTTAATTAAC-3'
EcoRI-PacI-XhoI if rev	5'-TCGAGTTAATTAACCG-3'
EcoRI-ApaI-PacI for	5'-AATTCGGGCCCTGTTAAT-3'
EcoRI-ApaI-PacI rev	5'-TAACAGGGCCCG-3'
cMyc-EcoRI-XhoI-BamHI for	5'-CCCACCATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATC TGGAATTCCTCGAGG-3'
cMyc-EcoRI-XhoI-BamHI rev	5'-GATCCCTCGAGGAATTCCCAGATCCTCTTCTGAGATGA GTTTTTGTTCATGGTGGGGTAC-3'
MycPac for	5'-AATTCGCTTAATTAAC-3'
MycPac rev	5'-TCGAGTTAATTAAGCG-3'

1.9.8 Oligonukleotide zur Sequenzierung

SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
5' DNA-BD	5'-TCATCGGAAGAGAGTAG-3'
3' DNA-BD	5'-GTCACCTTTAAAATTTGTATAC-3'
5' AD LD Insert	5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC-3'
3' AD LD Insert	5'-GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGAT-3'
pACT2 for	5'-TACCCATACGATGTTCCAGATTACG-3'
pACT2 rev	5'-TCAGTATCTACGATTCATAGATCTC-3'
8-28 for1	5'-AGGGTCAGAGGGCAAAGGG-3'
16-50 for1	5'-CGCCTCCCAAGTCCCCCTTC-3'
11-23 for1	5'-GGAGAAACTGCAGAATTCAAGAT-3'
11-23 for2	5'-GGAAGTGAACGGCAAGGAGC-3'
UMOD 421 for	5'-TTCCGCCTGTCGCCCCGGT-3'
UMOD 1741 for	5'-GTGGAGAATGGGGAGTCCTC-3'
UMOD AS 158 for	5'-CCGAATTCGGGGGTTGGACTGCGTGCCCG-3'
UMOD AS 298 for	5'-CCGAATTCGGGAGGAGTGCAGTATAGACGAG-3'
UMOD AS 419 for	5'-CCGAATTCGGATCAAAATCAACTTTGCATGCTCC-3'
CMX3	5'-CCAATTATGTCACACCA-3'
CMX5	5'-CCCCTGCTTAACTGGC-3'
GST for	5'-CCCATCCTGACTTCATGTTGTA-3'

1.10 Antikörper

1.10.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Anwendung	Hersteller
Polyklonaler anti-GAL4 DBD aus Kaninchen (SC-577)	Hefe	1:1000	Western Blot	Santa Cruz, Heidelberg
Monoklonaler anti-Uromodulin aus Maus (CL1032A)	Human	1:1000 1:3000	Immunohistologie	Cederlane Laboratories Burlington
Monoklonaler anti-Cytokeratine (hoch molekulare) aus Maus (34βE12)	Human	1:10	Immunohistologie	Dako, Hamburg
Monoklonaler anti-EMA (epithelial membrane antigen) aus Maus (E29)	Human	1:600	Immunohistologie	Dako, Hamburg
Monoklonaler anti-Polyduktin aus Maus (3G12)	Human	1:500	Immunohistologie	*

* Dieser Antikörper wurde freundlicherweise von Herr G. Wu (Vanderbilt Universität, Nashville USA) zur Verfügung gestellt.

1.10.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Anwendung	Hersteller
Meerrettich-Peroxidase-konjugiert aus Ziege	Kaninchen	1:1000	Western Blot	Pierce, Rockford (USA)
Dako REAL Biotin-konjugiert	Maus	Fertiglösung	Immunohistologie	Dako, Hamburg
Dako Cytomation EnVision Polymer-HRP-konjugiert	Maus	Fertiglösung	Immunohistologie	Dako, Hamburg

1.11 Geräte

Agarose-Gelelektrophoresesysteme	40-1214 B1	PeqLab Biotechnologie, Erlangen PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Bakterien-/Hefenschüttler	Innova 4000	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Kamera	Digitalkamera KY-F70B	JVC, London (UK)
Einbettautomat	Tissue Tek VIP	Miles Scientific, Niantic (USA)
ELISA-Lesegerät	ELX 800	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
Entwickler	X-O-Mat 1000 processor	Kodak, Rochester (USA)
Expositionskassetten	X-Ray Cassette IEC 60406	Rego X-Ray, Augsburg
Feinwaage	BP211S	Sartorius, Göttingen
Geltrockner	583 Gel dryer Slab gel dryer SE 1160	BioRad Life Science, München Hoefer scientific instruments, Holliston (USA)
Gießstation	Tissue Tek III	Miles Scientific, Niantic (USA)
Horizontalschüttler	KS 125 basic	Kika Labortechnik, Staufen
Immunostainer	TechMate 500 plus	Dako, Hamburg
Inkubator	B5060 E T6060	Memmert, Schwabach Heraeus, Hanau Heraeus, Hanau
Kryostat	CM 1900	Leica, Nussloch
Laborwecker	TR 118	Oregon scientific, Portland (USA)
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph, Schwabach
Mikroskope	Axioskop 50 020.519.011.DM LB 100S	Zeiss, Göttingen Leica, Nussloch
Mikrotom	CP 60 Grundschnittmicrotom	Microm, Walldorf Leica, Nussloch
Mikrowelle	NN 5256	Panasonic, Hamburg Siemens, München
Nass-Blot System	Mini Trans-Blot Electro- phoretic Transfer Cell	BioRad Life Science, München
Netzgerät	Consort EV 243 ebq 100 isolated-L	PeqLab Biotechnologie, Erlangen Leistungselectronic, Jena

pH-Meter/-Elektrode	Blueline pH 12	Schott, Mainz
Photometer	RS 232 C	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Research 10, 100, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
	20, 200 µl	Gilson, Middleton (USA)
	Handy Step	Brand, Wertheim
Pipettierhilfen	Pipetus akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Reinstwassersystem	Elix 5	Millipore, Schwalbach
Schnellmixer	Vortex-Genie 2	Scientific industries, New York (USA)
SDS-PAGE System	Mini PROTEAN Tetra Cell	BioRad Life Science, München
Sequenzierer	ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
Taumelrollenschüttler	RM5-V	
Thermocycler	Peltier Thermalcycler 200	Biozym, Oldendorf
Thermoschüttler	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallprozessor	UP 100 M	Dr. Hielscher, Teltow
Ultraturrax	T8	Kika Labortechnik, Staufen
UV-System/Kamera	Intas UV-Systeme/ Mitsubishi P91	Intas, Göttingen
Waage	CP 3202 P	Sartorius, Göttingen
	DA AI 300	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
	GFL 1052	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifugen	Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
	Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
	J2Mc	Beckman Coulter, Krefeld
	Laborzentrifuge 3K10	Sigma-Aldrich, München

1.12 Lösungen, Medien und Puffer

Zur Herstellung von Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 1,5 % Agar zugegeben. Der pH-Wert wurde, wenn nicht anders beschrieben, mit HCl bzw. NaOH eingestellt. Alle Lösungen wurden mit H₂O_{dd} angesetzt, soweit nicht anderes angegeben.

1.12.1 Bakterienmedien und Lösungen

5 x Luria-Bertani (LB)-Medium	50 g Pepton; 25 g NaCl; 25 g Hefeextrakt; add 1 L H ₂ O; autoklavieren
Terrific Broth (TB)-Medium	12 g Trypton; 24 g Hefeextrakt; 4 ml Glycerol; add 1 L H ₂ O; autoklavieren + 100 ml sterile Kaliumphosphat Salze
Kaliumphosphat Salze für TB-Medium	0,17 M KH ₂ PO ₄ ; 0,72 M K ₂ HPO ₄ ; autoklavieren
Ampicillin-Stammlösung	100 mg Ampicillin in 1 ml H ₂ O
Kanamycin-Stammlösung	30 mg Kanamycin in 1 ml H ₂ O
Chloramphenicol-Stammlösung	34 mg Chloramphenicol in 1 ml Ethanol

1.12.2 Hefemedien und Lösungen

Die Basismedien für der Anzucht von *S. cerevisiae* wurden als Fertigmedien von Clontech (St.-Germain-en-Laye (Fr)) bezogen. Die Aminosäurezusätze wurden von der Firma Bio101 (La Jolla, USA) bezogen. Die Medien wurden nach Herstellerangaben angesetzt.

10 x TE	0,1 M Tris-HCl; 10 mM EDTA; pH 7,5; autoklavieren
1,1 x TE/LiAc	1,1 ml 1 M Stammlösung LiAc; 1,1 ml 10 x TE-Puffer; add H ₂ O 10 ml
PEG/LiAc	8 ml 50 % PEG 3350; 1 ml 10 x TE-Puffer; 1 ml 1 M LiAc
Z-Puffer	10,78 g Na ₂ HPO ₄ ; 5,5 g NaH ₂ PO ₄ x 1 H ₂ O; 0,75 g KCl; 0,246 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; add 1 L H ₂ O; pH 7,0; autoklavieren

Z-Puffer mit β -Mercaptoethanol	0,27 % β -Mercaptoethanol in Z-Puffer
ONPG-Lösung	4 mg ONPG; 1 ml Z-Puffer; pH 7,0
Z-Puffer	10,78 g Na_2HPO_4 ; 5,5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1 \text{ H}_2\text{O}$; 0,75 g KCl; 0,246 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; add 1 L H_2O ; pH 7,0; autoklavieren
X-Gal-Stammlösung	20 mg X-Gal; 1 ml DMF
Z-Puffer mit X-Gal	0,27 % β -Mercaptoethanol; 1,67 ml X-Gal Stammlösung; add 100 ml Z-Puffer
Lyse-Puffer	8 M Harnstoff; 5 % SDS; 40 mM Tris-HCl (pH 6,8); 0,1 mM EDTA; 40 % Bromphenolblau
Kompletter Lyse-Puffer	1 ml Lyse-Puffer; 10 μl β -Mercaptoethanol; 100 μl Protease Inhibitor Cocktail

1.12.3 Lösungen zur Isolierung, Reinigung und Analyse von DNS

Lösung 1 (DNS-Minipräparation)	50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A
Lösung 2 (DNS-Minipräparation)	200 mM NaOH; 1 % SDS
Lösung 3 (DNS-Minipräparation)	3 M KAc; 5 M CH_3COOH
Qiagen-Puffer P1	50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A
Qiagen-Puffer P2	200 mM NaOH; 1 % SDS
Qiagen-Puffer P3	3,0 M KAc; pH 5,5
Qiagen-Puffer QBT	750 mM NaCl; 50 mM MOPS (pH 7,0); 15 % Isopropanol; 0,15 % Triton
Qiagen-Puffer QC	1 M NaCl; 50 mM MOPS (pH 7,0); 15 % Isopropanol
Qiagen-Puffer QF	1,25 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl (pH 8,5); 15 % Isopropanol
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg Ethidiumbromid/ml
5 x TBE	445 mM Tris; 445 mM Borsäure; 20 mM EDTA; pH 8,4

50 x TAE	2 M Tris; 1 M NaOAc; 50 mM EDTA
10 x Ladepuffer	49 % Glycerol; 49 % H ₂ O; 2 % 50 x TAE; 1 Spatelspitze Bromphenolblau
PEG-Lösung	52,4 g PEG 8000; 40 ml 3 M NaOAc (pH 5,2); 1,32 ml 1 M MgCl ₂ ; add 200 ml H ₂ O

1.12.4 SDS-Page und Immunoblotting

Lämmli-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl; 250 mM Glycin; 0,1 % SDS
Transferlösung	25 mM Tris-HCl; 192 mM Glycin; 20 % Methanol
Blocklösung	5 % Magermilchpulver; 0,1 % Tween 20 in PBS

1.12.5 GST-Proteininteraktionsstudien

Zelllysepuffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 250 mM NaCl; 1 % Triton; 1 mM DTT; 1 Tablette "Complete" (Protease Inhibitor Cocktail); add 100 ml H ₂ O
Interaktionspuffer	20 mM Hepes (pH 7,4); 50 mM KCl; 10 % Glycerol; 0,2 mM EDTA (pH 8,0); 10 mM DTT; 0,15 % NP40

1.12.6 Lösungen für die Immunohistologie

Citratpuffer	189,09 mg C ₆ H ₈ O ₇ (Citronensäure); 1,21 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2 H ₂ O (Natriumcitrat-Dihydrat); add 500 ml H ₂ O; pH 6,0
Tris-Puffer	60,57 g Tris-HCl; add 500 ml H ₂ O; + 430 ml 1 N HCl; pH 7,4-7,6

Hämalaun nach Mayer

1 g Hämatoxylin; 0,2 g NaJO_3 ; 50 g
 $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$; 50 g $\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3\text{O}_2$; 1 g
 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$; add 1 L H_2O

2. Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen

2.1.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung der kompetenten *E. coli* Zellen erfolgte nach der CaCl_2 -Methode [Nishimura et al., 1990]. Auf einer LB-Agarplatte wurde einen Verdünnungsausstrich des *E. coli*-Stamms aufgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit einer Einzelkolonie wurden 50 ml Vorkultur inokuliert, welche bei 37 °C und 200 upm über Nacht herangezogen wurde. 1 ml der Vorkultur wurde in 100 ml LB-Medium überführt und bis zur Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600} 0,3) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 4 °C und 4.500 g sedimentiert und in 50 ml 50 mM CaCl_2 -Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 min auf Eis wurden die Zellen unter den gleichen Bedingungen erneut sedimentiert und in 10 ml eiskalter 50 mM CaCl_2 -Lösung mit 15 % Glycerol resuspendiert. Aliquots der so erhaltenen kompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

2.1.1.2 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Unmittelbar nach dem Auftauen wurde Plasmid-DNS zugegeben. Die Ansätze wurden gründlich gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock bei 42 °C für 30 s unterzogen. Sofort nach dem Hitzeschock wurden die Zellen 1 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurden die Zellen 1 h bei 37 °C und 700 upm im Thermoschüttler geschüttelt. Im Anschluss wurden geeignete Mengen auf LB-Agarplatten mit Hilfe eines Drigalskispatels ausplattiert. Die Agarplatten enthielten ein für die Selektion geeignetes Antibiotikum.

2.1.1.3 Herstellung kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen wurde das „BD Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2“ von Clontech (St.-Germain-en-Laye (FR)) verwendet. Dieses beruht auf der Lithiumacetatmethode [Ito et al., 1983]. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers mit geringfügigen Änderungen.

Zunächst wurde von dem *S. cerevisiae* Stamm AH109 ein Verdünnungsausstrich auf eine YPDA-Agarplatte vorgenommen. Nach dreitägiger Inkubation bei 30 °C wurde eine Einzelkolonie verwendet, um 100 ml YPDA-Medium anzuimpfen. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 30 °C und 200 upm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 ml YPDA mit einem Teil der Vorkultur angeimpft, damit eine Ausgangs-OD₆₀₀ von 0,15-0,3 entstand. Die Kultur wurde bei 30 °C und 200 upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 herangezogen. Anschließend wurde 5 min bei 2.500 upm zentrifugiert (Beckmann Coulter J2Mc Zentrifuge). Das Sediment wurde mit 60 ml sterilem Wasser gewaschen und unter den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert.

Die Zellen wurden in 3 ml 1,1 x TE/LiAc resuspendiert und auf zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt. Nach einminütiger Zentrifugation bei 13.000 upm in einer Tischzentrifuge wurde das Sediment in 600 µl 1,1 x TE/LiAc pro Reaktionsgefäß resuspendiert. Für jede Transformation wurden frische kompetente Zellen hergestellt.

2.1.1.4 Transformation kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

Für die Transformation wurde das „BD Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2“ von Clontech (St.-Germain-en-Laye (FR)) verwendet.

Transformation einzelner Ansätze

Für Transformationen im kleinen Maßstab, wurde in vorgekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße die zu transformierende DNS (1- 1,5 µg) vorgelegt. 5 µl denaturierte Hering-Hoden-DNS und 50 µl der kompetenten *S. cerevisiae*-Zellen wurden zu jedem Ansatz zugesetzt. Der Ansatz wurde vorsichtig vermischt und anschließend mit 500 µl PEG/LiAc versetzt. Die Lösungen wurden gut vermischt und anschließend 30 min bei 30 °C in einem Thermoschüttler inkubiert. Alle 10 min wurden die Zellen erneut gut aufgeschüttelt. Nach Zugabe von 20 µl DMSO wurde ein Hitzeschock bei 42 °C für 15 min vorgenommen. Die Zellen wurden alle 5 min vorsichtig gemischt. Im Anschluss wurden die Zellen 1 min bei 13.000 upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, in 100 µl TE resuspendiert, und auf geeigneten Agarplatten ausplattiert.

Transformation der cDNS-Bibliothek

In ein vorgekühltes 15 ml Blaukappenröhrchen wurden 500 µg der Bibliothek-DNS und 1 mg des Plasmids pGBK-hcTerm vorgelegt. Zu diesem Ansatz wurden 20 µl denaturierte Hering-Hoden-DNS und 600 µl kompetente *S. cerevisiae*-Zellen zugesetzt. Nach vorsichtigem Mischen wurde 2,5 ml PEG/LiAc-Lösung zugesetzt. Diese Mischung wurde 45 min bei 30 °C inkubiert. Alle 15 min wurden die Zellen gemischt. Nach Zugabe von 160 µl DMSO erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 20 min. Alle 10 min wurden die Zellen vorsichtig gemischt. Durch Zentrifugation bei 2.500 upm für 5 min in einer Beckmann Coulter J2Mc-Zentrifuge wurden die Zellen sedimentiert und konnten anschließend in 3 ml YPD Plus Medium (Clontech, St.-Germain-en-Laye (FR)) resuspendiert werden. In diesem Medium wurden die Zellen 90 min bei 30 °C und 200 upm inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen wurden die Zellen in 15 ml 0,9 % NaCl-Lösung resuspendiert. Pro 15 cm Agarplatte wurden 150 µl diese Zellsuspension ausplattiert.

2.1.2 Isolierung, Reinigung und Detektion von Nukleinsäuren

2.1.2.1 Isolierung von Plasmid-DNS im analytischen Maßstab aus *E. coli*

Die Isolierung wurde nach der Methode der alkalische Lyse [Birnboim und Doly, 1979] durchgeführt. Über Nacht wurde hierzu ein einzelner Klon in 2,5 ml LB-Medium mit einem geeigneten Antibiotikum bei 37 °C und 200 upm kultiviert. 1,5 ml dieser Kultur wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und bei Raumtemperatur (RT) und 8.000 upm für 1 min in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Das Sediment wurde anschließend in 300 µl Lösung 1 (mit 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Lösung 2 wurde das Reaktionsgefäß mehrmals invertiert. Der Ansatz wurde mit Lösung 3 versetzt und erneut mehrmals invertiert. Das Zelllysate wurde daraufhin 10 min bei 13.000 upm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und zur Präzipitation der DNS mit 2/3 Volumen Isopropanol versetzt. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 13.000 upm wurde der Überstand restlos entfernt und die DNS mit 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen. Die präzipitierte DNS wurde luftgetrocknet und anschließend in 50 µl destilliertem Wasser aufgenommen.

2.1.2.2 Isolierung von Plasmid-DNS im präparativem Maßstab aus *E. coli*

Zur Gewinnung großer Mengen hochreiner Plasmid-DNS wurde das „HiSpeed Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) verwendet.

150 ml LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum wurde mit einem einzelnen Klon angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5.000 upm für 10 min in einer Beckmann Coulter J2Mc-Zentrifuge sedimentiert und anschließend in 10 ml Qiagen-Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Qiagen-Puffer 2 wurde 5 min inkubiert, um eine alkalische Lyse der Bakterienzellen zu ermöglichen. Anschließend wurden 10 ml eiskalter Qiagen-Puffer 3 zur Neutralisierung zugesetzt. Diese Mischung wurde direkt im Anschluss auf den Qiafilter gegeben.

Nach zehnminütiger Inkubation wurde der Ansatz durch den Qiafilter auf eine zuvor mit 10 ml Qiagen-Puffer equilibrierte Säule gedrückt. Nachdem die komplette Flüssigkeit durch die Säule getropft war, wurde die Säule mit 60 ml Qiagen-Waschpuffer QC gewaschen. Durch Zugabe von 15 ml Qiagen-Elutionspuffer QF wurde die DNS eluiert, und mit 10 ml Isopropanol gefällt.

Die DNS-Isopropanol-Mischung wurde mittels einer Spritze durch den Qiaprecipitator gedrückt. Anschließend wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und Luft durch den Qiaprecipitator gedrückt, um eventuelle Ethanol Reste zu entfernen. Mit Hilfe einer weiteren Spritze wurde die DNS mit Wasser aus dem Qiaprecipitator eluiert.

2.1.2.3 Isolierung von Plasmid-DNS im analytischen Maßstab aus *S. cerevisiae*

Für die Isolierung von Plasmiden aus *S. cerevisiae* wurde das „Qiaprep Spin Miniprep Kit“ von Qiagen verwendet nach einem von M. Jones (Chugai Institute for molecular medicine, Ibaraki, JP) entwickelten Protokoll.

5 ml eines geeigneten Selektionsmediums wurden mit einem einzelnen Klon angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 200 upm inkubiert. Diese Kultur wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 5000 g wurden die Zellen in 250 µl Qiagen-Puffer 1 resuspendiert. 100 µl säuregewaschene Glasperlen wurden hinzugegeben, und anschließend wurde 5 min gründlich gemischt. Nach einer kurzen Inkubation, damit die Glasperlen sedimentierten, wurde der Überstand in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 250 µl Qiagen-Puffer 2 zugegeben. Der Ansatz wurde mehrmals invertiert und anschließend für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 350 µl Qiagen-Puffer 3 wurde erneut mehrmals invertiert. Das Lysat wurde 10 min bei 13.000 upm zentrifugiert und der Überstand auf eine „Qiaprep Spin Column“ geladen. Im Anschluss wurde 1 min bei 13.000

upm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Mit 750 µl Qiagen-Puffer PE wurde die Säule gewaschen. Eine erneute Zentrifugation bei 13.000 upm für 1 min erfolgte, und der Durchfluss wurde wiederum verworfen. Um eventuelle Reste des Waschpuffers zu entfernen, wurde die Säule nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nachdem die Säule auf einem frischen 1,5 ml-Reaktionsgefäß platziert wurde, wurde die Plasmid-DNS mit 25 µl sterilem Wasser eluiert.

2.1.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Überprüfung der Quantität, sowie der Qualität der gewonnenen DNS-Lösungen wurde eine photometrische Messung vorgenommen. Die Messung erfolgte in Quartzküvetten. Die Absorption wurde bei 260 sowie 280 nm gemessen. Das DNS-Absorptionsmaximum liegt bei 260 nm, und daher erlaubt eine Messung bei dieser Wellenlänge eine Berechnung der Nukleinsäuren-Konzentration. Geht man von einem mittleren Absorptionskoeffizienten für die verschiedenen Nukleotide aus, bekommt man, unter Berücksichtigung des Lambert-Beer'schen Gesetzes, folgende Umrechnungsfaktoren:

1 Absorptionseinheit bei 260 nm \cong 50 µg/ml dsDNS bzw. \cong 33 µg/ml ssDNS

Durch eine Messung bei 280 nm kann der Gehalt an Proteinen in der Probe erfasst werden. Somit ist der Quotient 260/280 ein Maß für die Reinheit der Probe. Bei einer reinen DNS-Lösung liegt dieser Quotient zwischen 1,8 und 2,0.

2.1.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten verschiedener Größe, oder zur Bestimmung der Größe einzelner Fragmente, wurden horizontale Agarose-Gele verwendet. In Abhängigkeit der Größe der Fragmente wurden 0,7-2 %-ige Agarosegele angesetzt. Als Laufpuffer wurde TAE oder TBE gewählt.

Zu dem Agarose-Gel wurde Ethidiumbromid (200 ng/ml Endkonzentration) zugesetzt. Somit ist es möglich, die DNS mittels UV-Licht (254 nm) zu detektieren, da das Ethidiumbromid in die DNS interkaliert und bei Anregung durch UV-Licht fluoresziert.

Zur Beschwerung wurden die DNS-Proben mit 1/10 Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 5-6 Volt/cm durchgeführt. Die Nukleinsäuren durchwandern das Gel in Richtung Anode, ihre Geschwindigkeit ist von ihrer Größe abhängig, so dass eine Trennung von Fragmenten verschiedener Größen möglich ist.

Damit eine Abschätzung der Größe der Nukleotiden erfolgen konnte, wurde parallel ein DNS-Größenstandard aufgetrennt. Zur Dokumentation des DNS-Fragmente-Musters wurde das Intas UV- Dokumentationssystem verwendet.

2.1.2.6 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Das erwünschte DNS-Fragment wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit einem Skalpell, unter dem UV-Transilluminator, aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Isolierung der Nucleinsäuren aus dem Gel stand ein „Qiaquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) zur Verfügung. Es wurde nach Angaben der Hersteller verfahren. Hierbei wurde das Agarosestück, welches die DNS enthält, in dem entsprechenden Puffer bei 50 °C geschmolzen. Anschließend wurde die DNS an einen Silicat-Matrix gebunden, welche sich in der Säule des Kits befindet. Die DNS wurde gewaschen und mit sterilem Wasser eluiert.

2.1.2.7 Phenol-/Chloroform-Extraktion von DNS-Lösungen

Eine Phenol-/Chloroform-Extraktion kann Proteinverunreinigung aus DNS-Lösungen entfernen. Hierzu wurde die DNS-Lösung mit dem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol (25:24:1) versetzt und gründlich gemischt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 13.000 upm bilden sich eine organische und eine wässrige Phase, welche durch eine proteinhaltige Interphase getrennt werden. Die wässrige Phase, welche die DNS enthält, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Eine Extraktion mit Chloroform folgte, um eventuelle Phenol-Reste zu entfernen. Dazu wurde die wässrige Phase mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt, gut gemischt und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach Überführung der wässrigen Phase in ein frisches Reaktionsgefäß wurde die DNS, wie unter 2.1.2.8 beschrieben, präzipitiert.

2.1.2.8 Ethanol-Präzipitation von DNS-Lösungen

Die DNS wurde durch Zugabe von 0,1 Volumeneinheiten Natriumacetat (pH 4,6) und 2-3 Volumeneinheiten 100 %-igem Ethanol präzipitiert. Der Ansatz wurde mehr als 30 min bei – 80 °C inkubiert und anschließend 30 min bei 13.000 upm und 4 °C zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde die DNS mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde restlos entfernt, die DNS getrocknet und in einem geeigneten Volumen sterilem Wasser resuspendiert.

2.1.2.9 PEG-Präzipitation von Polymerase-Kettenreaktion-Produkten

Um die direkte Sequenzierung von Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Produkten ohne Zwischenklonierung in ein Plasmid zu ermöglichen, wurde eine PEG-Präzipitation durchgeführt. Hierzu wurde der PCR-Ansatz mit dem gleichen Volumen an PEG-Lösung versetzt. Nachdem gut gemischt wurde, wurde 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 min bei 13.000 upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNS mit 100 %-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation, wurde der Überstand restlos entfernt, die DNS getrocknet und anschließend in einer geeigneten Menge sterilem Wasser resuspendiert.

2.1.3 Enzymreaktionen mit DNS

2.1.3.1 Restriktion der DNS mit Restriktionsendonukleasen

Bei Verwendung der Restriktionsenzyme wurden die Angaben des Herstellers in Bezug auf optimale Temperatur und Puffer befolgt, um somit optimale Reaktionsbedingungen zu gewährleisten. Für analytische Restriktionsansätze wurde ein Ansatzvolumen von 20 µl gewählt. Es wurden 0,5-1 µg Plasmid-DNS mit 10 Einheiten des Enzyms und 2 µl des 10 x Reaktionspuffers eingesetzt, der Ansatz wurde mit sterilem Wasser aufgefüllt. Die Enzymreaktion wurde für mindestens 1 h bei einer geeigneten Temperatur durchgeführt.

Für präparative Ansätze wurde das Volumen so gewählt, dass das Volumen der zugesetzten Enzyme max. 10 % des Gesamtvolumens betrug. Es wurden 5-10 µg Plasmid-DNS mit bis zu 80 Einheiten des Enzyms und 1/10 des Gesamtvolumens an Reaktionspuffer eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für mindestens 3 h bis über Nacht bei der geeigneten Temperatur.

2.1.3.2 Dephosphorylierung von 5'-DNS-Überhängen

Um die Effizienz einer Ligation zu erhöhen, kann die Rezirkulation des linearisierten Vektors durch Dephosphorylierung von 5'-DNS-Überhängen mittels alkalischer Phosphatase verhindert werden. Hierzu wurden 50-100 ng linearisierte Vektor-DNS mit 1 µl alkalischer Phosphatase (aus der Garnele) und 1 µl Reaktionspuffer versetzt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Die Enzymreaktion wurde für 20 min bei 37 °C durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 15 min bei 65 °C, um das Enzym zu inaktivieren.

2.1.3.3 Ligation von DNS-Fragmenten

Die Ligation von DNS-Fragmenten wurde mit dem Enzym T4-DNS-Ligase durchgeführt, welche die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNS-Ketten katalysiert. Hierzu wurden 50-100 ng Vektor-DNS im gleichen molaren Verhältnis bzw. mit einem molaren Überschuss (1:3 und 1:5) des zu inserierenden DNS-Fragments, einer Enzymeinheit T4-Ligase, sowie dem vom Hersteller mitgeliefertem Ligasepuffer vermischt und mit sterilem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Als Kontrolle der Effizienz diente ein Ansatz, bei dem der Vektor ohne zu inserierendes DNS-Fragment eingesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte 2 h bei RT oder über Nacht bei 16 °C.

2.1.3.4 Klonierung von PCR-Produkten

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde das „TOPO-TA-Cloning Kit“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Dieses Kit macht sich eine wichtige Eigenschaft vieler thermostabiler DNS-Polymerasen zunutze, nämlich eine Matritzenunabhängige Transferaseaktivität, durch welche ein singuläres Desoxyadenosin an das 3'-Ende des PCR-Produkts angefügt wird. Der Vektor pCR®II-TOPO, welcher linearisiert vorliegt, hat singuläre 3'-Thymidinüberhänge. Das Enzym Topoisomerase I ist kovalent an den Plasmidenden gebunden und kann die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen dem PCR-Produkt und dem Vektor katalysieren.

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung des PCR-Ansatzes wurde das gewünschte PCR-Fragment aus dem Gel aufgereinigt (siehe: 2.1.2.6). Je nach Quantität der DNS wurde 2-4 µl des Eluats für die Klonierungsreaktion verwendet. Es wurden 1 µl Salzlösung und 1 µl Vektor zugesetzt, und der Gesamtansatz wurde mit sterilem Wasser auf 6 µl aufgefüllt. Anschließend wurde 5 min bei RT inkubiert.

Von diesem Klonierungsansatz wurden 2 µl zu den chemisch kompetenten TOP10-Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 s. Direkt in Anschluss wurden die Zellen wieder auf Eis gestellt, und 250 µl SOC-Medium wurde zugesetzt. In diesem Medium wurden die Zellen 1 Stunde bei 37 °C und 200 upm inkubiert und anschließend auf X-Gal behandelte LB-Platten mit Ampicillin ausgestrichen, welche über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden.

Der pCR®II-TOPO-Vektor enthält das LacZ-Gen, welches für die α -Untereinheit der β -Galactosidase kodiert. Enthalten Bakterien einen religierten Vektor, so besitzen sie ein intaktes LacZ-Gen. Die β -Galactosidase ist in der Lage das Galaktosederivat X-Gal umzusetzen, wobei ein schwerlöslicher Indigofarbstoff entsteht. Bakterienkolonien mit einem

religierten Vektor färben sich somit blau. Wurde jedoch das PCR-Fragment erfolgreich in den Vektor einkloniert, so wird das LacZ-Gen unterbrochen und das X-Gal kann nicht abgebaut werden. Bakterien, welche ein Vektor mit inserierten DNS-Fragment enthalten, bleiben somit weiß.

2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Einzelne DNS-Abschnitte können mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR: Polymerase Chain Reaction) spezifisch und exponentiell amplifiziert werden [Saiki et al., 1985]. Im ersten Schritt wird hierzu die doppelsträngige DNS bei 95 °C denaturiert. Durch Absenkung der Temperatur wird anschließend die Hybridisierung von synthetischen Oligonukleotiden, die eventuell zusätzlich zur Klonierung benötigte Restriktionsstelle enthalten, an den komplementären Bereich der Matritzen-DNS ermöglicht. Eine hitzeresistente Polymerase, meistens die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, verwendet diesen doppelsträngigen Bereich als Startpunkt für die DNS-Synthese komplementär zum Matritzenstrang unter Verwendung von dNTPS. Hierbei entsteht ein neuer DNS-Doppelstrang, welcher im nächsten Zyklus nach der Denaturierung als Vorlage für die Synthese dient. Mehrfaches Wiederholen diesen Zyklus hat eine exponentielle Vermehrung des zwischen den Oligonukleotiden befindlichen DNS-Bereichs zur Folge.

2.1.4.1 PCR zur Amplifikation des C-Terminus von Polyduktin

Für die Herstellung des Köderproteins musste der Bereich der cDNS, der für den C-Terminus von Polyduktin kodiert, amplifiziert werden. Damit eine anschließende Klonierung im Leserahmen möglich war, wurden die Oligonukleotide so entworfen, dass 5' eine *EcoRI*-Schnittstelle bei der Amplifikation der cDNS angebracht wurde, sowie 3' eine *BamHI*-Schnittstelle.

Es wurden 50 ng des Plasmids pGEX-4T1-c-term-PKHD1, 3 µl MgCl₂ (50 mM), 5 µl Reaktionspuffer (10 x), 1 µl dNTPs (10 mM), 2,5 Einheiten Taq-Polymerase und je 10 pmol der Oligonukleotide „PKHD1-c-for“ und „PKHD1-c-rev“ zusammen pipettiert und mit destilliertem Wasser auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt.

Das verwendete Amplifikationsprogramm setzte sich wie folgt zusammen:

Denaturierung	94 °C	2 min	} 25 Zyklen
Denaturierung	94 °C	30 s	
Oligonukleotid-Anlagerung	65 °C	1 min	
Elongation	72 °C	1 min	
Elongation	72 °C	5 min	

2.1.4.2 Amplifikation von cDNS-Fragmenten direkt aus dem Hefeklon

Zur Amplifikation von cDNS-Fragmenten potentieller Interaktionspartner wurde eine PCR entwickelt, bei der die Amplifikation direkt aus dem Hefeklon erfolgte. Hierzu wurde mit einem sterilen Zahnstocher der Hefeklon in 25 µl 20 mM NaOH überführt und resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension 10 min bei 95 °C inkubiert und direkt im Anschluss stark geschüttelt. Es wurde 1 min bei 13.000 upm in der Tischzentrifuge zentrifugiert, um die Reste der Hefezellen zu sedimentieren. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Für die anschließende PCR wurde 1 µl dieser Lösung eingesetzt. Zudem befanden sich 1,5 µl MgCl₂ (50 mM), 5 µl Reaktionspuffer (10 x), 1 µl dNTPs (10 mM), 2,5 Einheiten Taq-Polymerase und je 10 pmol der Oligonukleotide „5'AD LD Insert“ und „3'AD LD Insert“ in dem PCR-Ansatz, welcher mit sterilem Wasser auf 50 µl aufgefüllt wurde.

Für die Amplifikation der cDNS-Fragmente wurde folgendes Temperaturprofil verwendet:

Denaturierung	95 °C	2 min	} 25 Zyklen
Denaturierung	95 °C	30 s	
Oligonukleotid-Anlagerung	60 °C	30 s	
Elongation	72 °C	2 min	
Elongation	72 °C	5 min	

2.1.4.3 PCR zur Amplifikation der OFD1-cDNS

Damit die Aktivität verschiedener Mutanten von OFD1 überprüft werden konnte, mussten verschiedene Bereiche der OFD1-cDNS amplifiziert werden.

Die cDNS-Fragmente sollten im Leserahmen in ein Expressionsplasmid einkloniert werden. Um dies zu ermöglichen, wurde 5' eine *EcoRI*-Schnittstelle und 3' eine *PacI*-Schnittstelle mittels der für die Amplifikation verwendeten Oligonukleotide eingebracht. Für die

Amplifikation und anschließende Klonierung der gesamten cDNS im Leserahmen wurde 5' eine *ApaI*-Schnittstelle angefügt.

Für alle Ansätze wurde folgender PCR-Ansatz gewählt: 10 ng des Plasmids pCRII-OFD1, 1,5 µl MgCl₂ (50 mM), 5 µl Reaktionspuffer (10 x), 1 µl dNTPs (10 mM), 2,5 Einheiten Taq-Polymerase und je 10 pmol der Oligonukleotide. Folgende Oligonukleotid-Kombinationen wurden gewählt: „OFD1-*ApaI*-for“ und „OFD1-AS-1012-rev“; „OFD1-AS-560-for“ und „OFD1-AS-956-rev“; „OFD1-AS-705-for“ und „OFD1-AS-1012-rev“; „OFD1-AS-797-for“ und „OFD1-AS-956-rev“, sowie „OFD1-AS-797-for“ und „OFD1-AS-1012-rev“.

Zur Amplifikation wurde folgendes Programm verwendet:

Denaturierung	95 °C	2 min	} 20 Zyklen
Denaturierung	95 °C	30 s	
Oligonukleotid-Anlagerung	55 °C	30 s	
Elongation	72 °C	1,5 min	
Elongation	72 °C	5 min	

Im Fall der Amplifikation mit den Oligonukleotiden „OFD1-*ApaI*-for“ und „OFD1-AS-1012-rev“ erfolgte die Elongation jeweils 3,5 min mit einer abschließenden Elongationsphase von 7 min.

2.1.4.4 PCR zur Amplifikation der NPR1-cDNS

Vier Mutanten von NPR1 wurden hergestellt, indem verschiedene Bereiche der NPR1-cDNS amplifiziert wurden. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sie beim Amplifikation der gewählten cDNS-Bereiche 5' eine *EcoRI*-Restriktionsstelle und 3' eine *XhoI*-Restriktionsstelle anbrachten. Diese Restriktionsstellen wurden benötigt, um die Klonierung im Leserahmen zu ermöglichen.

Als Matritzen-DNS dienten 10 ng des Plasmids pBSR-NPR1. Außerdem wurden 1,5 µl MgCl₂ (50 mM), 5 µl Reaktionspuffer (10 x), 1 µl dNTPs (10 mM), 2,5 Einheiten Taq-Polymerase und je 10 pmol der Oligonukleotide zugesetzt. Der Ansatz wurde mit sterilem Wasser auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt.

Es wurden folgende Kombinationen von Oligonukleotiden für die Amplifikationen gewählt: „NPR1-AS-705-for“ und „NPR1-AS-1010-rev“; „NPR1-AS-763-for“ und „NPR1-AS-1061-rev“; „NPR1-AS-985-for“ und „NPR1-AS-1010-rev“, sowie „NPR1-AS-985-for“ und „NPR1-AS-1061-rev“.

Folgendes Programm wurde für die Amplifikation der cDNS verwendet:

Denaturierung	95 °C	2 min	} 20 Zyklen
Denaturierung	95 °C	30 s	
Oligonukleotid-Anlagerung	55 °C	30 s	
Elongation	72 °C	1 min	
Elongation	72 °C	5 min	

2.1.4.5 PCR zur Amplifikation der C7-cDNS

Eine Amplifikation der gesamten C7-cDNS, sowie eines partiellen Bereichs der cDNS wurde durchgeführt. Damit eine anschließende Klonierung in Leserahmen möglich war, wurden die Oligonukleotide so gewählt, dass sie bei der Amplifikation 5' eine *PacI*-Schnittstelle und 3' eine *XhoI*-Schnittstelle ansynthetisierten.

Für beide Amplifikationen wurde folgender Ansatz verwendet: 10 ng des Plasmids pCMV-C7, 1,5 µl MgCl₂ (50 mM), 5 µl Reaktionspuffer (10 x), 1 µl dNTPs (10 mM), 2,5 Einheiten Taq-Polymerase und je 10 pmol der Oligonukleotide. Für die Amplifikation der gesamten cDNS wurde die Oligonukleotide „C7-AS-1-for“ und „C7-AS-843-rev“ verwendet. Zusätzlich wurde noch ein Bereich mit den Oligonukleotiden „C7-AS-335-for“ und „C7-AS-843-rev“ amplifiziert.

Beide Amplifikationen wurden mit folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung	95 °C	5 min	} 20 Zyklen
Denaturierung	95 °C	30 s	
Oligonukleotid-Anlagerung	55 °C	30 s	
Elongation	72 °C	3,5 min	
Elongation	72 °C	5 min	

2.1.4.6 PCR zur Amplifikation der UMOD-cDNS

Für die Charakterisierung der Aktivität von Uromodulin wurden verschiedene Bereiche, sowie die komplette cDNS amplifiziert. Die anschließende Klonierung im Leserahmen sollte über eine Restriktion mit *EcoRI* und *XhoI* erfolgen. Zu diesem Zweck wurden diese Schnittstellen mit Hilfe der Oligonukleotide an die cDNS angebracht.

Für die verschiedenen Amplifikationen wurden je 10 ng des Plasmids pDNR-UMOD als Matrizen-cDNS verwendet, 1,5 µl MgCl₂ (50 mM), 5 µl Reaktionspuffer (10 x), 1 µl dNTPs (10 mM), 2,5 Einheiten Taq-Polymerase und je 10 pmol der Oligonukleotide.

Mittels folgender Oligonukleotid-Kombinationen wurden die gewünschte Fragmente amplifiziert: „UMOD-AS-1-for“ und „UMOD-AS-640-rev“; „UMOD-AS-158-for“ und „UMOD-AS-444-rev“; „UMOD-AS-298-for“ und „UMOD-AS-557-rev“; „UMOD-AS-419-for“ und „UMOD-AS-444-rev“, sowie „UMOD-AS-419-for“ und „UMOD-AS-640-rev“.

Das für den Amplifikation verwendete Programm setzt sich wie folgt zusammen:

Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	} 20 Zyklen
Oligonukleotid-Anlagerung	55 °C	30 s	
Elongation	72 °C	1 min	
Elongation	72 °C	5 min	

Für der Amplifikation der gesamten cDNS wurde ein abweichendes Programm verwendet. Hier betrug die Elongationszeit 3,5 min, bzw. 7 min im terminalen Elongationsschritt. Alle anderen Bedingungen waren wie oben beschrieben.

2.1.5 Sequenzierung von DNS

Die Sequenzierung der DNS wurde nach dem Prinzip des „Cycle Sequencing“ durchgeführt, welche auf dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger beruht [Sanger et al., 1977]. Die Sequenzierungsreaktionen wurden unter Verwendung des „Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing“-Kit der Firma Applied-Biosystems (Darmstadt) durchgeführt. Für die Analyse der Reaktionsprodukte durch Kapillarelektrophorese wurde ein automatischer „DNA-Sequencer“ der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) genutzt. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der Software DNAMAN V.4.11 (Lynnon BioSoft) ausgewertet. Zur Auswertung der DNS-Sequenzen wurden das Computerprogramm HUSAR (Heidelberg UNIX Sequence Analysis Resources) des DKFZ (Heidelberg), <http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/w2h/w2hdkfz/>) und die Datenbanken Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und Swissprot (<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>) verwendet.

2.2 Hefe-zwei-Hybrid-Methoden

Das verwendete Hefe-Zwei-Hybrid-System basiert auf der biologischen Wirkung des Transkriptionsfaktors GAL4 aus *Saccharomyces cerevisiae* [Fields und Song, 1989]. Das Protein besteht aus zwei funktionellen Domänen, einer DNS-Bindungsdomäne und einer Aktivierungsdomäne. Die einzelnen Domänen des Transkriptionsfaktors GAL4 können keine Transkription von GAL4-abhängigen Genen bewirken, dies geschieht nur, wenn beide Domänen vorhanden und sich in räumlicher Nähe zu einander befinden.

Die DNS-Bindungsdomäne wird mit dem Köderprotein fusioniert, während die Aktivierungsdomäne mit einer Expressions-Bibliothek fusioniert ist. Findet eine Interaktion zwischen dem Köderprotein und einem Protein aus der cDNS-Bibliothek statt, so sind beide GAL4 Domänen gekoppelt und können als Transkriptionsaktivator funktionieren. GAL4-abhängige Reportergene (ADE2, HIS3, lacZ und MEL1) werden hierauf exprimiert.

Die beiden Plasmide werden in den *S. cerevisiae*-Stamm AH109 kotransformiert. Die entstandenen Transformanten werden auf Medium, dem Tryptophan (Trp) und Leucin (Leu) fehlt, ausplattiert. Somit kann auf die Aufnahme beider Plasmide selektioniert werden, da diese jeweils einen dieser Selektionsmarker enthalten.

Für die Selektion von Transformanten, welche eine Interaktion zwischen dem Köderprotein und dem Protein aus der cDNS-Bibliothek aufweisen, wird ein Medium verwendet, dem zusätzlich Adenin (Ade) und Histidin (His) fehlt und das X- α -Gal enthält.

2.2.1 Amplifizierung und Reinigung der cDNS-Bibliothek

Für das Hefe-zwei-Hybrid-Experiment wurde eine humane fötale Nieren-cDNS-Bibliothek der Firma Clontech (St.-Germain-en-Laye (FR)) verwendet. Zur Amplifizierung der Bibliothek wurde der gelieferte *E. coli* BNN132 Stamm, welcher die Bibliothek enthält, auf LB-Amp Agarplatten ausplattiert. Hierbei wurden etwa 5×10^4 Klone pro Platte ausplattiert. Um die Repräsentativität der Bibliothek zu gewährleisten, wurde die dreifache Menge an unabhängigen Klonen ausplattiert, was etwa 1×10^7 Klone entspricht. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C über Nacht.

Die Klone wurden mit Hilfe eines Drigalski-Spatels in je 5 ml LB-Amp pro Platte resuspendiert. Die *E. coli*-Suspension wurde in einem Kolben vereint und 1 h bei 37 °C und 200 upm inkubiert. Anschließend wurde 15 min bei 5000 upm und 4 °C zentrifugiert.

Mit Hilfe des „Nucleobond Megakit“ von BD Bioscience (Heidelberg) wurde die DNS nach Angaben des Herstellers isoliert. Das Sediment wurde in 90 ml Lösung S1 resuspendiert. Nach Zugabe von 90 ml Lösung S2 und mehrmaligem Invertieren wurde 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss hierzu wurden 90 ml S3 zugesetzt, invertiert und 5 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde auf einen Gaze-Filter gegeben und der gesamte Ansatz bei 5.000 upm für 20 min bei 4 °C zentrifugiert.

Währenddessen wurde die Nucleobond AX 2000 Säule mit 20 ml Lösung N2 equilibriert. Das Lysat wurde auf die Säule pipettiert. Der Durchfluss wurde aufgefangen und ein weiteres Mal auf die Säule gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit der Lösung N3 wurde die DNS mit 25 ml Lösung N5 eluiert.

Durch Zugabe von 18 ml Isopropanol und anschließender Zentrifugation für 30 min bei 7.000 upm und 4 °C wurde die DNS gefällt. Eiskalter 70 %-iger Ethanol wurde verwendet, um die DNS zu waschen. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 7.000 upm und 4 °C wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und anschließend in 1 ml Wasser resuspendiert.

2.2.2 ONPG-Test

Der ONPG-Test erlaubt eine Quantifizierung der Interaktionsintensität, welche im Hefe-zwei-Hybrid-System beobachtet wird. Es beruht auf der Hydrolyse von o-Nitrophenol- β -D-galactopyranosid (ONPG) durch β -Galactosidase zu o-Nitrophenol und D-Galactose, wobei ein gelber Farbstoff entsteht, der photometrisch gemessen werden kann.

Ein Hefeklon von circa 3 mm Durchmesser wurde in 5 ml geeignetem Selektionsmedium angeimpft. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 30 °C und 250 upm inkubiert. Anschließend wurde eine 1:5 Verdünnung dieser Übernachtskultur in YPD-Medium vorgenommen, und die Kulturen weiter bei 30 °C und 250 upm inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,5-0,8 erreicht wurde. Die exakte OD₆₀₀ wurde notiert.

Von jeder Kultur wurden dreimal 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß gegeben. Die Ansätze wurden 1 min bei 13.000 upm zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 1,5 ml Z-Puffer gewaschen und ein weiteres Mal für 1 min bei 13.000 upm zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend in 300 μ l Z-Puffer resuspendiert, von denen 100 μ l in ein frisches Reaktionsgefäß überführt wurden.

Die Hefen wurden, durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C im Wasserbad, aufgeschlossen. Den so aufgebrochenen Zellen wurde 700 μ l Z-Puffer mit

0,27 % β -Mercaptoethanol zugesetzt. Die Zeitmessung wurde gestartet und sofort zu allen Proben 160 μ l ONPG-Lösung pipettiert. Die Proben wurden im Wasserbad bei 30 °C inkubiert, bis eine deutliche Gelbfärbung statt gefunden hatte. Die benötigte Zeit wurde notiert und die Reaktion wurde mit 400 μ l 1 M Na_2CO_3 gestoppt.

Zum Abtrennen der Zelltrümmer wurde 10 min bei 13.000 upm zentrifugiert, und anschließend 1 ml der Lösung in einen Küvette überführt. Die Messung der OD_{420} erfolgte unmittelbar im Anschluss.

Eine β -Galactosidase-Einheit ist als die Menge definiert, welche 1 μ mol ONPG zu o-Nitrophenol und D-Galactose hydrolysiert pro Minute und pro Zelle. Diese kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$1.000 \times \frac{\text{OD}_{420}}{t \times V \times \text{OD}_{600}}$$

t = die Zeit bis zur Gelbfärbung in Minuten

V = 0,1 ml x Konzentrationsfaktor

$\text{OD}_{600} = A_{600}$ von 1 ml Kultur

2.2.3 β -Galactosidase-Filter-Test

In eine Petrischale wurde ein rundes Whatmann-Filter-Papier #5 mit einem Durchmesser von 90 mm in 3 ml Z-Puffer/X-Gal-Lösung getränkt.

Ein zweiter Whatmann-Filter wurde auf die Agarplatte, welche die zu testenden Klone enthält, gelegt und vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette angedrückt. Nach Abziehen des Filters von der Agarplatte befanden sich die Hefenklone an dem Filter.

Durch Einfrieren der Filter in flüssigem Stickstoff und Wiederauftauen wurden die Zellen aufgeschlossen. Der Filter mit den aufgebrochenen Hefezellen wurde luftblasenfrei auf den X-Gal-durchtränkten Filter gelegt. Anschließend wurden die Filter bei 30 °C inkubiert bis eine Blaufärbung sichtbar wurde.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 *In vitro*-Translation von Proteinen

Für die *in vitro*-Translation von Proteinen wurde das „TNT Quick coupled Transcription/Translation Systems“ Kit von der Firma Promega (Mannheim) verwendet. Dieses enthält alle benötigten Komponenten für eine Transkription/Translationsreaktion in zellfreien eukaryontischen Systemen. In ein Reaktionsgefäß wurden 40 µl des „TNT Quick Master Mix“ vorgelegt. Hierzu wurde 1 µg des zu transkribierenden und zu translatierenden Plasmids, sowie 2 µl [³⁵S]-Methionin (10 mCi/ml) gegeben. Der Ansatz wurde mit Nuclease-freiem Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 60-90 min bei 30 °C.

2.3.2 Proteinextraktion aus Hefezellen

50 ml YPD-Medium wurden mit dem *S. cerevisiae* Stamm AH109 angeimpft bzw. Selektionsmedium mit den Transformanten. Nach Inkubation über Nacht bei 30 °C und 200 upm wurden die Kulturen mit den jeweiligen Medien auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt.

Eine weitere Inkubation erfolgte bei 30 °C und 200 upm, bis die Kulturen eine OD₆₀₀ von 0,4-0,5 erreicht hatten. 15 ODs wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, welches bis zur Hälfte mit Eis gefüllt war.

Nach Zentrifugation bei 1.000 g für 5 min bei 4 °C in einer Beckmann Coulter J2Mc Zentrifuge wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 25 ml Wasser gewaschen. Die Hefezellen wurden in einem zweiten Zentrifugationsschritt sedimentiert und anschließend in 2 ml Wasser aufgenommen.

Nach Einfrieren der Hefezellen in flüssigem Stickstoff wurde 100 µl kompletter Lyse-Puffer, der vorher auf 70 °C erwärmt wurde, pro 7,5 OD, sowie 80 µl Glasperlen (425-600 µm) zugesetzt. Dieser Ansatz wurde 10 min bei 70 °C inkubiert und direkt in Anschluss 1 min kräftig geschüttelt.

Durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 13.000 upm und 4 °C in einer Tischzentrifuge wurden die Glasperlen von den Proteinextrakten getrennt, und der Extrakt wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Eine weitere Extraktion erfolgte indem nochmals 50 µl kompletter Lyse-Puffer pro 7,5 OD zu den Glasperlen gegeben wurde, 3-5 min bei 95 °C inkubiert und in Anschluss nochmals für 1

min geschüttelt wurde. Nach Trennung der Glasperlen vom Überstand mittels Zentrifugation wurden die Überstände vereinigt.

Vor der elektrophoretischen Auftrennung wurden 25 µl der Probe mit 8 µl 4 x Roti-Load versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert.

2.3.3 Expression und Extraktion von GST-Proteinen

Um Proteininteraktionen zu studieren, wurden Fusionsproteine aus Glutathion-S-Transferase mit Mutanten des zu untersuchenden Proteins hergestellt. Nachdem die cDNS in den korrekten Leserahmen hinter die Glutathion-S-Transferase kloniert worden war, wurde dieses Plasmid wie unter 2.1.1.2 beschrieben, in den *E. coli* Stamm BL21pLysS transformiert.

40 ml LB-Medium mit einem geeigneten Antibiotikum wurden mit einem Klon angeimpft und etwa 16 h bei 37 °C und 200 upm inkubiert. Die Übernachtskultur wurde 1:10 in LB-Amp verdünnt und bei 37 °C und 200 upm weiter inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,7 erreicht wurde. Eine Probe von 1 ml wurde zur Überprüfung der Induktion entnommen.

Die Expression des GST-Fusionsproteins wurde durch IPTG-Zugabe (0,5 mM Endkonzentration) induziert. Die Kultur wurde anschließend für weitere 3 h bei 37 °C und 200 upm inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde 1 ml Probe entnommen. In Anschluss wurde die restliche Kultur in einen Zentrifugenbecher überführt und bei 4 °C und 5.000 g für 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10 ml Zelllysepuffer resuspendiert. Um eine gute Lyse der Zellen zu gewährleisten, wurde der Ansatz dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37 °C im Wasserbad wieder aufgetaut. Zusätzlich wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Hierzu wurden die Ansätze 3 x 10 s bei einer Amplitude von 60 % dem Ultraschall ausgesetzt. Um unlösliche Bestandteile von den Proteinextrakten zu trennen, wurde bei 10.000 upm und 4 °C in einer Beckman Coulter J2Mc zentrifugiert.

2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen wurde der „Protein Assay“ der Firma BioRad Life Science (München) verwendet. Dieser wurde vor Gebrauch 1:5 mit Wasser verdünnt. Für jeder Messung wurden 200 µl diese Lösung in eine Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte vorgelegt. Es wurde jeweils 1 µl der Proteinlösung oder eine geeignete

Verdünnung hinzu pipettiert. Nach 10 min Inkubation bei RT erfolgte die Messung der entstandenen Blaufärbung in einem ELISA-Reader bei 595 nm.

Durch Ermittlung einer Regressionsgerade einer BSA-Eichgerade konnten die unbekannten Proteinmengen berechnet werden.

2.3.5 Kopplung von GST-Proteinen an Sepharose

Für die Kopplung von Proteinen an Sepharose wurde „Glutathione-Sepharose 4B“ von Amersham Bioscience (Freiburg) verwendet. Für jeden Ansatz wurde 100 µl Sepharose verwendet, welche sich aus 50 µl Sepharosekügelchen und 50 µl Puffer zusammensetzt. Die Sepharose wurde dreimal mit 500 µl PBS gewaschen und bei 2.000 upm in einer Tischzentrifuge bei 4 °C abzentrifugiert.

Zur vorbereiteten Sepharose wurden die GST-Protein-Extrakte gegeben. Hierbei wurde die gleiche Menge Protein für alle Ansätze gewählt, eventuelle Unterschiede der Volumina wurde mit Zelllysepuffer ausgeglichen. Die Extrakte wurden 1 h bei Raumtemperatur mit der Sepharose auf einem Taumelrollenschüttler inkubiert.

Anschließend wurde dreimal mit 1 ml Interaktionspuffer gewaschen und bei 4 °C und 2.000 upm in der Tischzentrifuge zentrifugiert.

2.3.6 Proteininteraktionsstudien

Für die Durchführung der Proteininteraktionsstudien wurden die GST-Fusionsproteine, oder GST alleine als Kontrolle, wie unter 2.3.5 beschrieben, an Sepharose gekoppelt.

Nach Entfernen der nicht gebundenen Proteine durch dreimaliges Waschen mit je 1 ml Interaktionspuffer wurde der Ansatz in 500 µl Interaktionspuffer aufgenommen und das zweite Protein, welches radioaktiv markiert wurde (siehe: 2.3.1), hinzugegeben.

Damit gleiche Mengen an markiertem Protein von unterschiedlichen Mutanten zugesetzt wurde, wurden vorab gleiche Volumina auf einem SDS-Gel aufgetragen, das Gel getrocknet und ein Film aufgelegt. An Hand der Exposition auf dem Film wurden gleiche Mengen an markiertem Protein abgeschätzt.

Nach Zugabe des zweiten Proteins wurde 1 h bei Raumtemperatur auf dem Taumelrollenschüttler inkubiert. In Anschluss wurde dreimal mit je 1 ml Interaktionspuffer gewaschen.

Nach vollständiger Entfernung der Flüssigkeit wurde 20 µl 2 x Roti-Load zu den Sepharose-Kügelchen pipettiert und 10 min bei 95 °C denaturiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 10.000 upm und 4 °C in der Laborzentrifuge 3K10 von Sigma (München). Der Überstand wurde zur elektrophoretischen Trennung auf ein SDS-Polyacrylamidgel (siehe: 2.3.7) aufgetragen.

Nach der elektrophoretischen Trennung und Trocknen auf dem „Gel Dryer model 583“ der Firma BioRad Life Science (München) wurde die Autoradiographie mit „BioMax Light“ Filme (Kodak, Rochester (USA)) bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.3.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden [Lämmli, 1970]. In Abhängigkeit des Molekulargewicht der Fragmente wurden 8-12 %-ige Polyacrylamidgele angesetzt. Verwendet wurde das „Mini-PROTEAN Tetra cell-System“ von BioRad Life Science (München). Die Apparatur wurde nach Angaben des Herstellers zusammen gebaut. Die Elektrophorese fand bei 15 mA im Sammelgel und 20 mA im Trenngel statt.

Um eine Abschätzung des Molekulargewichtes der Proteine zu ermöglichen, wurde ein Molekulargewichtsstandard mit aufgetrennt. Verwendet wurde der SeeBluePlus2-Proteinstandard von Invitrogen (Karlsruhe).

2.3.8 Western Blot und Immundetektion

Für den Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran wurde das Nass-Blottersystem „Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell“ von BioRad Life Science (München) verwendet. Hierzu wurden auf einem Träger ein Schwämmchen, 2 Whatmann-Papiere, das Gel, die PVDF-Membran, 2 Whatmann-Papiere und ein weiteres Schwämmchen aufgebaut. Alle Komponenten wurden vorher in Transferpuffer getränkt. Die PVDF-Membran wurde 1 min in Methanol, 1 min in Wasser und anschließend 1 min in Transferpuffer äquilibriert.

Der Transfer erfolgte mehr als 2 Stunden bei Raumtemperatur und 30 Volt oder über Nacht bei 4 °C und 30 Volt.

Nachdem mittels Coomassiefärbung (siehe: 2.3.9) der Erfolg des Transfers überprüft wurde, wurde die Membran 1 h in Blockierungslösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem primären Antikörper bei Raumtemperatur in einem 50 ml Blaukappenröhrchen auf dem Taumelrollenschüttler. Ungebundener Primärantikörper wurde durch drei Waschschriffe mit 5 % Magermilchpulver in PBS-T von je 10 min auf dem Rollenschüttler entfernt. Eine einstündige Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper erfolgte bei Raumtemperatur auf dem Taumelrollenschüttler. Ungebundener Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit 5 % Magermilchpulver in PBS-T und einem einmaligen Waschschriff mit PBS-T entfernt.

Als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase wurde das „ECL Plus western blotting detection System“ von GE Healthcare (Chalfont St. Giles (UK)), nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach zweiminütiger Inkubation wurde das überschüssige Reagenz von der Membran entfernt. Die Visualisierung des Chemolumineszenz-Signals erfolgte durch Exponierung auf einem Kodak Röntgenfilm.

2.3.9 Coomassiefärbung von Proteinen

Zur Coomassiefärbung von Proteinen wurde das „SimplyBlue“ Färbereagenz (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Das Gel oder die Membran wurde 1 h in einem Behälter mit ausreichend SimplyBlue unter Schütteln gefärbt. Anschließend wurde 1 h unter ständigem Schütteln mit Wasser entfärbt.

2.4 Histologische und immunhistologische Methoden

Die hier beschriebenen Schritte wurden freundlicherweise von Frau A. Röper, Frau C. Neumann, bzw. Frau S. Steiner durchgeführt.

Die immunhistologische Untersuchung auf Polyduktin wurde wie von Zhang et al. [2004] beschrieben durchgeführt.

2.4.1 Paraffinblöcke und Herstellung von Paraffinschnitten

Die Paraffinblöcke von Nierengewebe von ARPKD-Patienten wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med K. Zerres vom Institut für Humangenetik der RWTH Aachen zur Verfügung gestellt bzw. waren im Archiv des Instituts für Pathologie vorhanden, die Paraffinblöcke mit Kontrollgewebe kamen ebenfalls aus dem Archiv des Instituts für Pathologie.

Mit Hilfe des Mikrotoms „Microm CP60“ wurden 2 µm Schnitte angefertigt. Nach Glätten im Wasserbad bei 45 °C wurden die Schnitte auf Objektträger (für Verwendung in der DAKO TechMate 500 auf Kapillarspalt-Objektträger) aufgezogen und über Nacht bei 37 °C getrocknet.

2.4.2 HE-Färbung histologischer Schnitte

Die Paraffinschnitte wurden zuerst 10 min in Xylol entparaffiniert und anschließend durch eine abführende Ethanolreihe dehydratiert. Hierbei wurden die Schnitte kurz in 96 %-igen, 70 %-igen und dann in 50 %-igen Ethanol gestellt und anschließend in destilliertem Wasser gespült. Für die Färbung erfolgte zuerst eine Inkubation von 10 min in Hämatoxylin nach Mayer. Anschließend wurden die Schnitte 10 min in warmem Leitungswasser gebläut und kurz in destilliertem Wasser gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation von 10 s in Eosin und kurzes Abspülen in destilliertem Wasser. Die Schnitte wurden nun durch eine aufsteigende Ethanolreihe in Xylol geführt und schließlich mit Pertex 3000 eingedeckt.

2.4.3 Immunohistologie auf Paraffinschnitten nach der Avidin-Biotin-Methode (ABC)

Diese Methode beruht auf der starken Affinität von Avidin zur Biotin. Es handelt sich um einen indirekten Nachweis, der in drei Schritten durchgeführt wird. Im ersten Schritt wird ein unkonjugierter Primärantikörper verwendet, welcher ein Epitop des gesuchten Proteins erkennt. Im zweiten Schritt wird ein Antikörper verwendet, der mit Biotin konjugiert und gegen die Fc-Region des Primärantikörpers gerichtet ist. Im dritten Schritt wird Streptavidin eingesetzt, welches an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Das Streptavidin bindet das Biotin des zweiten Antikörpers. Nach Zugabe eines geeigneten Chromogens findet, in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid, dessen Oxidation statt, wodurch ein Farbprodukt entsteht, welches im Lichtmikroskop sichtbar ist.

Für die Durchführung wurden die Schnitte zuerst 10 min in Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe geführt (10 min in 100 %, kurz in 96 %-igem und 70 %-igem Alkohol). Anschließend wurden die Schnitte in 1 M Tris-Puffer (pH 7,4-7,6) gespült.

Zur Demaskierung der Antigene nach der Formalinfixierung, wurden die Schnitte, für den immunohistologische Untersuchung auf Uromodulin, 30 min in Citratpuffer (pH 6,0) bei 600 W in der Mikrowelle behandelt. Anschließend fand eine 20-minütige Abkühlphase statt. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte in 1 M Tris-Puffer (pH 7,4-7,6) gewaschen. Für die Untersuchung auf EMA wurde keine Demaskierung vorgenommen.

Die Färbung erfolgte semiautomatisch im DAKO TechMate 500. Der anti-Uromodulin Antikörper wurde 1:1000 bzw. 1:3000 in „Antibody Diluent“ der Firma Dako verdünnt. Der anti-EMA Antikörper wurde 1:600 verdünnt. Die Schnitte wurden 1 h mit einer dieser Antikörperlösungen inkubiert. Es erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Anschließend wurde 10 min geblockt, um unspezifische Bindestellen ab zu sättigen. Eine Inkubation von 30 min mit dem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Streptavidin erfolgte, wonach das Chromogen für 5 min zugesetzt wurde. Beim verwendeten Chromogen handelt es sich um eine stabile Pufferlösung aus Wasserstoffperoxid und 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC)). Zuletzt erfolgte noch eine Kernfärbung für 30 s mit Hämalaun nach Mayer. Schließlich wurden die Schnitte mit dem wasserlöslichen Eindeckmittel Aquatex eingedeckt.

2.4.4 Immunohistologie auf Paraffinschnitten nach der EnVision (Polymerkonjugat)-Methode

Das Gewebe wurde, wie unter 2.4.3 beschrieben, entparaffiniert. Im nächsten Schritt wurde eine Blockierung der endogenen Peroxidasen mit 30 % Wasserstoffperoxid in Methanol für 30 min durchgeführt. Im Anschluß wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gespült. Zur Demaskierung der Antigene wurden die Schnitte dreimal 5 min in Citratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle bei 600 W behandelt. Nach Abspülen der Schnitte mit PBS erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C mit dem 34βE12-Antikörper, 1:10 verdünnt in PBS. Im Anschluss wurden die Schnitte kurz mit PBS gespült und mit 100 µl unverdünntem EnVision-Komplex (Dako, Hamburg) eine halbe Stunde bei RT inkubiert.

Die Schnitte wurden kurz mit PBS gewaschen und dann 10 min in einem Gemisch aus Diaminobenzidin und 30 % Wasserstoffperoxid gefärbt. Anschließend wurde 10 min mit Leitungswasser gewaschen und nochmals mit destilliertem Wasser nachgespült.

Zuletzt erfolgte noch eine Kernfärbung für 30 s mit Hämalaun nach Mayer. Die Schnitte wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt und anschließend mit dem Eindeckmittel Entellan eingedeckt.

III. Ergebnisse

Bei dem verwendeten Hefe-zwei-Hybrid-System handelt es sich um das „Matchmaker Yeast-two-Hybrid-System 3“ (Clontech, St.-Germain-en-Laye (FR)). Der pGBKT7 Vektor kodiert für die DNS-Bindungsdomäne von Transkriptionsfaktor GAL4, der an das Köderprotein fusioniert wird. Die verwendete cDNS-Bibliothek befindet sich im Vektor pACT2, so dass ein Fusionsprotein aus dem cDNS-Fragment der Bibliothek und der Aktivierungsdomäne von GAL4 hergestellt werden kann. Abb. 3.1 stellt schematisch das Prinzip des Hefe-zwei-Hybrid-Experiments dar. Wird durch die Interaktion ein den GAL4-Transkriptionsfaktor substituierender „zwei-Hybrid-Komplex“ hergestellt, erfolgt durch die DNS-Bindung der GAL4-DNS-Bindungsdomäne die Aktivierung von Reportergenen (*lacZ*, *HIS3*, *ADE2* und *MEL1*).

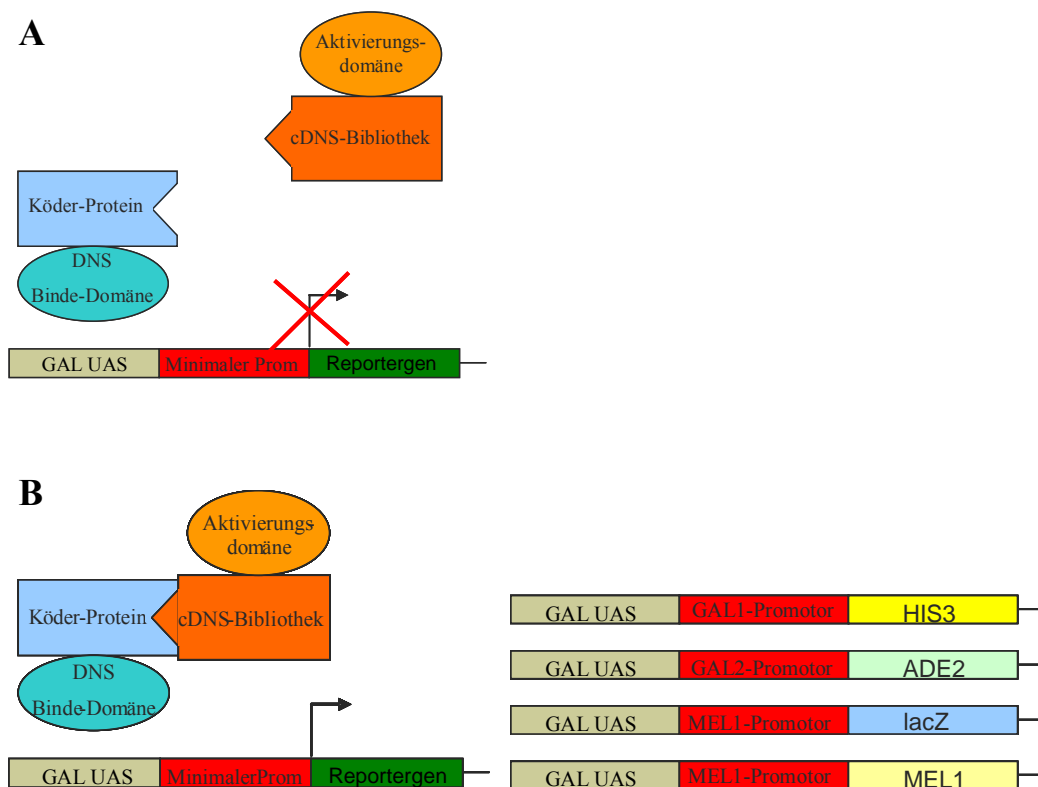


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Hefe-zwei-Hybrid-Prinzips

A) Findet keine Interaktion zwischen dem Köderprotein und einem Protein aus den Bibliothek statt, so sind die GAL4 DNS-Bindungsdomäne und die Aktivierungsdomäne getrennt und es findet keine Expression der Reportergene statt. B) Eine Interaktion zwischen Köderprotein und einem Protein aus dem Bibliothek resultiert in einem funktionsfähigen GAL4-Transkriptionsfaktors und somit in der Expression von *HIS3*, *ADE2*, *lacZ* und *MEL1*.

UAS: 5'-Aktivatorsequenz (upstream activator sequens); Prom: Promotor

In allen durchgeführten Hefeexperimenten wurde eine Kotransformation von den Vektoren pGBKT7 53 und pGADT7 T als Positivkontrolle verwendet. Bei dem pGADT7 T-Vektor handelt es sich um ein Plasmid, das sich nur in der Sequenz der multiplen Klonierungsstelle von pACT2 unterscheidet. pGBKT7 53 kodiert für ein Fusionsprotein aus der DNS-Bindungsdomäne von GAL4 und murinem p53, während pGADT7 T die Herstellung eines Fusionsproteins aus der Aktivierungsdomäne von GAL4 und dem SV40 “Large-T”-Antigen ermöglicht. Von diesen Proteinen ist bekannt, dass sie eine starke Interaktion zeigen [Li und Fields, 1993; Iwabuchi et al., 1993]. Im Folgenden wird eine Kotransformation dieser beiden Vektoren nur mit Positivkontrolle bezeichnet.

Als Negativkontrolle wurde in allen Hefeexperimenten eine Kotransformation der Vektoren pGBKT7 Lam und pGADT7 T durchgeführt. pGBKT7 Lam kodiert für ein Fusionsprotein aus der DNS-Bindungsdomäne von GAL4 und humanem Lamin C. Es ist bekannt, dass keine Interaktion mit dem SV40 “Large-T”-Antigen stattfindet [Bartel et al., 1993; Ye und Worman, 1995]. Eine Kotransformation dieser beiden Proteine wird im Folgenden nur als Negativkontrolle bezeichnet.

Medium, das kein Leucin (Leu) und Tryptophan (Trp) enthält wird als niedrig-stringentes Medium bezeichnet, da es lediglich auf die Aufnahme beider Vektoren selektioniert. Medium ohne Histidin (His), Leu und Trp wird als mittel-stringentes, während Medium ohne Adenin (Ade), His, Leu und Trp als hoch-stringentes Medium bezeichnet wird, weil diese Medien zudem auf die Expression eines bzw. zweier Reportergene selektionieren.

1. Herstellung des Köderkonstrukts

1.1 Klonierung des Köderkonstrukts

Für die Durchführung des Hefe-zwei-Hybrids-Screens wurde der cytoplasmatische C-terminale Bereich von Aminosäure 3881 bis 4074 von humanem Polyduktin als Köder gewählt. Der hierfür kodierende cDNS-Abschnitt wurde mittels PCR mit dem Oligonukleotiden „PKHD1-c-for“ und „PKHD1-c-rev“ aus dem Plasmid pGEX-4T1-c Term PKHD1 amplifiziert, und mit den Enzymen *EcoRI* und *XhoI* hinter die GAL4 DNS-Bindungsdomäne des Expressionsvektors pGBKT7 kloniert, so dass ein Fusionsprotein exprimiert werden kann. Dieses Konstrukt wurde pGBK-hcTerm benannt.

1.2 Überprüfung der Expression von pGBK-hcTerm

Das Plasmid pGBK-hcTerm wurde in *S. cerevisiae* AH109 transformiert und auf Minimalmedium ohne Trp drei Tagen kultiviert. Dieses Medium selektioniert Hefeklone, welche das Plasmid aufgenommen haben. Ein Western Blot wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob das Fusionsprotein exprimiert wird. Die Immundetektion erfolgte mit dem polyklonalen Anti-GAL4 DBD Antikörper, welcher ein Epitop in der DNS-Bindungsdomäne von GAL4 erkennt.

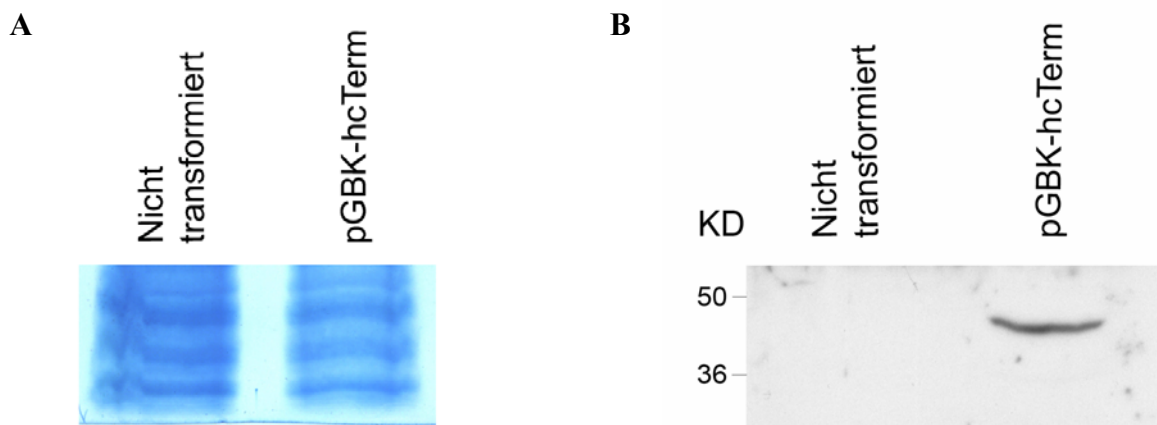


Abb. 3.2: Western Blot der Expression des Fusionsproteins aus der GAL4 DNS-Bindungsdomäne und dem C-Terminus von Polyduktin

Western Blot von Zellextrakten aus *S. cerevisiae* AH109, die ohne oder mit pGBK-hcTerm transformiert wurden. Auftrennung der Proteinextrakte erfolgte auf einem 10 %-igen PAA-Gel. A) Die Coomassie-Färbung der Membran weist nach, dass gleiche Mengen Proteinextrakt aufgetragen wurden. B) Die Immundetektion erfolgte mittels Anti-GAL4 DBD Antikörper, welcher das 41 kDa große Fusionsprotein in den transformierten Hefen detektiert.

Wie aus Abb. 3.2 hervorgeht, wurde nur in den Transformanten ein Fusionsprotein von ~ 41 kDa detektiert. Dies entspricht der errechnete Größe des Fusionsproteins. Die gleichmäßige Beladung des Gels wurde durch eine Coomassie-Färbung der Membran bestätigt.

1.3 Überprüfung der Autoaktivierung von pGBK-hcTerm

Bevor ein Hefe-zwei-Hybrid-Screen durchgeführt werden kann, muss ausgeschlossen werden, dass das Köderprotein selbst Reportergene transkriptionell aktivieren kann (sogenannte Autoaktivierung), um somit falsch-positive Klone zu vermeiden. Hierzu wurde pGBK-hcTerm mit pGADT7 in *S. cerevisiae* AH109 kotransformiert.

Die Transformanten wurden auf niedrig-stringentem Medium angezogen. Nur Hefen die beide Plasmide aufgenommen haben, sind in der Lage, Trp und Leu zu synthetisieren und in diesem Medium zu wachsen. Zudem enthält das Medium X- α -Gal. Im Falle einer Autoaktivierung würden die Klone aufgrund α -Galactosidaseexpression in der Lage sein, dass X- α -Gal umzusetzen, wobei ein schwerlöslicher Indigofarbstoff entsteht. Keine der Transformanten zeigte eine Blaufärbung, während die Positivkontrolle sich deutlich blau färbte (Siehe Abb. 3.8). Es kann somit geschlossen werden, dass es keine Autoaktivierung des Konstruktes gibt.

2. Hefe-zwei-Hybrid-Screen

2.1 Kotransformation C-Terminus von Polyduktin und cDNS-Bibliothek

pGBK-hcTerm wurde mit einer humanen fötaler Nieren-cDNS-Bibliothek in *S. cerevisiae* AH109 kotransformiert. Ungefähr 1×10^7 Transformanten wurden auf niedrig-stringentem Minimalmedium mit X- α -Gal ausplattiert. 2.668 Klone exprimierten die α -Galactosidase. Die hohe Zahl an blauen Transformanten deutet auf zahlreiche, schwache oder unspezifische Interaktionen hin. Die Klone wurden achtmal mittels eines Stempels auf hoch-stringentes Medium überimpft. Dabei wurden 727 Transformanten isoliert.

2.2 Erste Auswahl potentieller Kandidaten

Um eine erste Auswahl zwischen den vielen Kandidaten zu treffen, wurde mit 87 potentiell positiven Hefeklonen ein ONPG-Test durchgeführt. Dieser Test erlaubt nicht nur die Überprüfung der β -Galactosidase-Aktivität, sondern auch deren Quantifizierung. Da die Expression von β -Galactosidase direkt abhängig von der Stärke der Interaktion zwischen dem C-Terminus von Polyduktin und dem Protein aus der Bibliothek ist, können mit dem ONPG-Test diejenigen Proteine identifiziert werden, die die stärkste Interaktion aufweisen. Es wurde so in sechs Klone eine starke Interaktion nachgewiesen.

Zunächst wurden die Plasmide der Bibliothek aus den potentiell positiven Klonen isoliert, in *E. coli* propagiert, wiederum in *S. cerevisiae* AH109 zusammen mit pGBK-hcTerm zurücktransformiert und ein ONPG-Test durchgeführt (siehe Abb. 3.3).

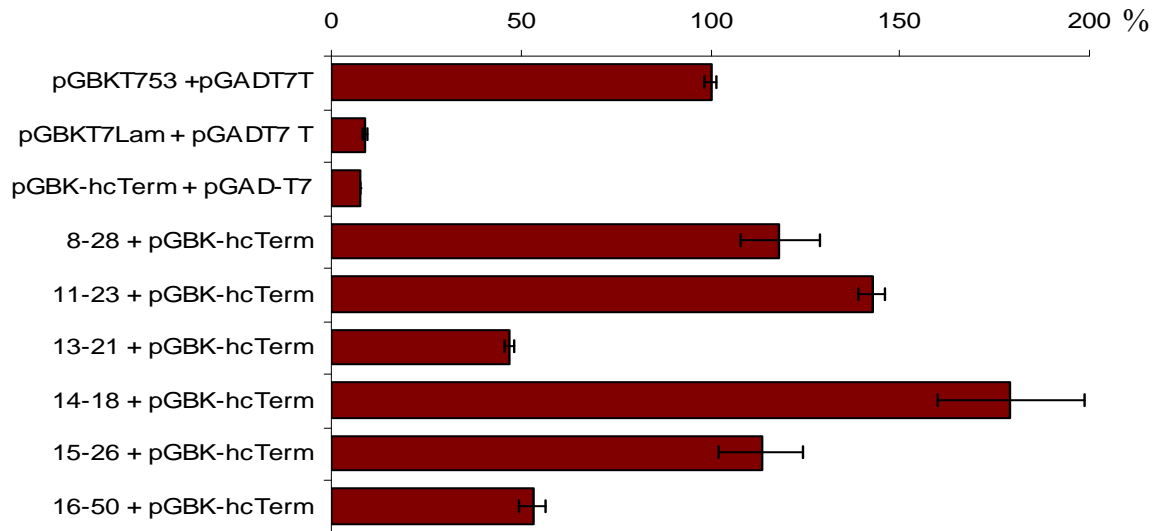


Abb. 3.3: Interaktion zwischen den isolierten Klonen mit dem C-Terminus von Polyduktin und deren relative β -Galactosidase-Aktivität.

Die angegebenen Plasmidpaare wurden in *S. cerevisiae* AH109 transformiert und auf Minimalmedium ohne Trp und Leu angezogen. Die erhaltenen Transformanten wurden im quantitativen ONPG-Test analysiert. Als Positivkontrolle diente murines p53 und SV40 "Large-T"-Antigen. Die Aktivität der Positivkontrolle wurde gleich 100 % gesetzt, die übrigen Werte relativ hierzu berechnet. Für die Negativkontrolle wurde eine Kotransformation von humanem Lamin C-Protein mit dem SV40 "Large-T"-Antigen verwendet. Zur Überprüfung der Autoaktivierung wurde zudem pGBK-hcTerm mit pGADT7 kotransformiert.

Rote Balken stellen die jeweilige relative β -Galactosidase-Aktivität dar. Mittelwert und Standardabweichung beziehen sich auf die Messungen von Triplikaten.

Die Klone 8-28, 11-23, 14-18 und 15-26 zeigen eine relative β -Galactosidase-Aktivität die ähnlich stark, oder stärker, als die der Positivkontrolle ist. Die Klone 13-21 und 16-50 haben eine relative β -Galactosidase-Aktivität, die deutlich über dem Wert der Negativkontrolle liegt und etwa 50 % der relativen β -Galactosidase-Aktivität der Positivkontrolle entspricht. Hieraus geht hervor, dass sechs der getesteten putativen Interaktionspartner eine starke Interaktion mit dem C-Terminus von Polyduktin im ONPG-Test zeigen. Diese sechs Transformanten wurden im Folgenden weiter untersucht.

2.3 Auswahl potentieller Kandidaten

Alle sechs Klone wurden sequenziert und ein Sequenzvergleich mit folgenden DNS- und Protein-Datenbanken durchgeführt: Computerprogramm HUSAR (Heidelberg UNIX Sequence Analysis Resources) des DKFZ (Heidelberg), <http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/w2h/w2hdkfz/>) und den Datenbanken Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und Swissprot (<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>).

Aus den Sequenzierungsergebnissen wurde ersichtlich, dass die cDNS-Bibliothek teilweise fehlerhaft war. In einigen der Klone wurden neben kodierenden Sequenzen Intronsequenzen vorgefunden, bei anderen gab es eine Verschiebung des Leserahmens. Der Datenbankvergleich ergab, dass die cDNS-Fragmente der Klone 13-21 und 15-26 im nicht translatierten Bereich der Gene Cytochrome P450 bzw. Collagen Type IV $\alpha 2$ -Kette liegen. Diese beiden Klone wurden somit von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Bei den weiteren Klonen wurde an Hand von Literaturangaben entschieden, ob eine Interaktion mit Polyduktin *in vivo* möglich wäre. Auswahlkriterien waren das Vorkommen der jeweiligen Proteine in Nierengewebe, so weit bekannt in den gleichen Nierenstrukturen wie Polyduktin und eine subzelluläre Lokalisation, die eine Interaktion ermöglichen würde. Da der C-Terminus von Polyduktin ins Cytoplasma hineinragt und zudem nach proteolytischer Spaltung in den Nukleus transloziert, kommen sowohl cytoplasmatische Proteine als auch nukleäre Proteine als Interaktionspartner in Betracht, ebenso wie Membranproteine, Proteine, die in Komplexen vorliegen und Proteine, die gemeinsam prozessiert werden.

Bei Klon 8-28 handelt es sich um ein cDNS-Fragment des „mixed lineage leukaemia translocated to 10“ (MLLT10). Eine Rolle für dieses Protein als Transkriptionsfaktor wird diskutiert [DiMartino et al., 2002]. Es handelt sich um ein Protein, das im Cytoplasma und im Kern nachgewiesen werden konnte und in der Niere exprimiert wird [Linder et al., 1998; Linder et al., 2000]. Obwohl die Voraussetzungen für eine mögliche Interaktion zwischen MLLT10 und Polyduktin gegeben sind, wurde diese putative Interaktion aufgrund der limitierten Zeit nicht genauer analysiert.

Es konnte mittels Sequenzierungen und anschließenden Datenbankvergleichen gezeigt werden, dass es sich bei den Klonen 11-23 und 14-18 um das gleiche cDNS-Fragment handelt und zwar um die C-terminalen Aminosäure 645 bis 843 der Komplement Komponente-7 (C7: component 7). Es wurde im weiteren Verlauf nur noch mit dem Klon 11-23 weiter gearbeitet. C7 ist ein Plasmaprotein und eine der fünf Komplement Komponenten (C5b, C6, C7, C8 und

C9) die zusammen den Membranangriffskomplex (MAC: membran attack complex) bilden und eine Rolle in der Immunabwehr übernehmen.

Bei Klon 16-50 handelt es sich um den Natriuretische Peptid Rezeptor 1 (NPR1), ein Membranprotein. Das cDNS-Fragment, das sich in Klon 16-50 befindet kodiert für die Aminosäuren 985 bis 1010, die cytoplasmatisch lokalisiert sind. Zudem ist von NPR1 bekannt, dass es in hohem Maße in der Niere exprimiert wird [Lowe et al., 1989].

Zwei Klone, die durch ihr Wachstum auf hoch-stringentem Medium und die Expression von α -Galactosidase auffielen, zeigten im initialen ONPG-Tests schwache Expression von β -Galactosidase. Die Sequenzierungen ergaben, dass es sich um cDNS-Fragmente von Uromodulin (Klon 6-19) und OFD1 (oral facial digital syndrome 1) (Klon 18-18) handelte. Weiterhin zeigte sich, dass sich neben Exon- auch kurze Intronsequenz in dem Uromodulin-Klon befand. Da Mutationen in Uromodulin sowohl für MDCK2 als auch für glomerulozystische Nierenerkrankungen verantwortlich gemacht werden, ist dieses Protein von besonderem Interesse bei der Untersuchung von möglichen Interaktionspartnern von Polyduktin.

Bei OFD1 lag eine Leserahmverschiebung vor. OFD1 ist in das oral fazial digital Syndrom 1 involviert. Diese Erkrankung zeichnet sich unter anderem dadurch aus, dass die Patienten Nierenzysten entwickeln. Zudem ist von dem Protein bekannt, dass es an den Zilien lokalisiert, wie viele der Proteine, die in polyzystische Nierenerkrankungen mutiert sind. Zudem gibt es Vermutungen, dass OFD1 mit Polyduktin direkt interagiert (C. Bergmann, AG Zerres, persönliche Mitteilung). Aus diesem Grund wurden Uromodulin und OFD1 für weitere Experimente ausgewählt.

In Tabelle 3.1 ist ein Übersicht über die verschiedenen Klone, deren Homologie zu bekannten Proteinen und deren Expressionsort sowie Lokalisation dargestellt.

Klon-Nr.	Homologie (Nucleotid-Angaben relativ zum Translationsstartpunkt)	Lokalisation	Expressionsort
6-19	Uromodulin nt 1255-1331	Über GPI extrazellulär an Membran gebunden [Rindler et al. 1990; Cavallone et al., 2001], Cytoplasma [Peach et al., 1988; Rindler et al. 1990; Hodaňová, 2005]	Niere: aufsteigender Ast der Henle-Schleife, distaler Tubulus [Peach et al., 1988; Sikri et al., 1979 ¹]
8-28	Mixed lineage leukaemia translocated to 10 (MLLT10) nt 688-1051	Nukleus [Linder et al., 2000; Linder et al., 1998] Cytoplasma [Linder et al., 1998]	Niere, Gehirn [Linder et al., 1998 ²], Thymus, Testis [Linder et al., 1998; Chaplin et al., 1995] Ovar, Kolon, periphere Blut-Lymphozyten [Chaplin et al., 1995]
11-23/ 14-18	Complement component 7 (C7) nt 1933-3918	Plasmaprotein, mit vier weiteren Proteinen (C5b, C6, C8 und C9) bildet es einen Proteinkomplex (Membrane attack complex, MAC). C7 ermöglicht den Einbau des MACs in der Membran. [Thompson und Lachmann, 1970; Preissner et al., 1985]	Leber [Würzner et al., 1994; Naughton et al., 1996], Gehirn [Gasque et al., 1995], Endothel [Langeegg et al. 2000], Knochenmark [Naughton et al., 1996], Monocyten [Hetland et al., 1986], Alveolarmakrophagen [Hetland et al., 1987], Fibroblasten [Garred et al., 1990]
13-21	Cytochrome P450 1B1 nt 2462-4083	Nukleus, in proximalen und distalen Tubuli der Niere und sekretorischen Zellen der Brustdrüse auch im Cytoplasma [Muskhelishvili et al., 2001]	Niere, Gehirn, Prostata, Brust, Gebärmutterhals, Uterus, Ovar, Lymphknoten [Muskhelishvili et al., 2001]
15-26	Collagen Type IV α2-Kette nt 5780-5975	Basalmembran [Timpl et al., 1981 ²]	In allen Basalmembranen [Kleppel et al., 1989]
16-50	Natriuretic Peptid Receptor 1 (NPR1) nt 2953-3031	Zellmembran [Hirsch et al., 2001]	Niere: Sammelrohre, Henle-Schleife [Hirsch et al., 2001], Nebenniere, Fettgewebe, Krummdarm, Plazenta [Lowe et al., 1989], Lunge, Aorta [Nagase et al., 1997 ³], Gehirn [Herman et al., 1996 ³], vaskuläre glatte Muskulatur [Suga et al., 1992 ³]
18-28	Oral facial digital syndrome 1 (OFD1) nt 2390 ~ 3300	Zentrosomen [Romio et al. 2004], Nukleus [Giorgio et al., 2007] und primäre Zilien [Romio et al., 2004; Giorgio et al., 2007]	Niere: proximale Tubuli, distale Tubuli und Sammelrohre [Romio et al., 2004], Lunge, Gehirn, Herz [Conciliis et al., 1998; Romio et al., 2003], Skelettmuskel, Leber, Plazenta, Pankreas, [Conciliis et al., 1998], Zunge, Gliedmaßen, Darm [Romio et al., 2003]

Tab. 3.1: Übersicht der potentiell positiven Klonen

Dargestellt sind die sechs Transformanten, welche eine hohe β -Galactosidase-Aktivität zeigten, sowie UMOD und OFD1. Die Homologie zu bekannten Proteinen, Expressionsort und Lokalisation, sind ebenfalls in der Tabelle dargestellt.

Daten aus: ¹ Hamstergewebe; ² Mausgewebe; ³ Rattgewebe

3. Untersuchung der potentiellen Interaktion zwischen Polyduktin und OFD1

3.1 Klonierung verschiedener OFD1-Mutanten und der vollständigen cDNS

Für die Untersuchung, ob eine Interaktion zwischen Polyduktin und OFD1 vorliegt, wurde der cDNS-Klon IRAMp995O172Q2 vom RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH) bezogen.

Eine PCR mit den Oligonukleotiden „OFD1 *ApaI* 1 for“ und „OFD1 AS 1012 rev“ amplifizierte die vollständige cDNS, welche in den pCRII-TOPO-Vektor ligiert wurde. Zunächst musste eine *ApaI*-Schnittstelle in den pACT2-Vektor durch Einfügen der Oligonukleotide „EcoRI-*ApaI*-*PacI* for und rev“, eingebracht werden. Das so erhaltene Plasmid wurde pACT2-*ApaI* genannt. Nach Restriktion mit *ApaI* und *PacI* wurde die vollständige OFD1-cDNS aus pCRII-TOPO ausgeschnitten und im Leserahmen hinter die Aktivierungsdomäne von GAL4 in pACT2-*ApaI* kloniert.

Die Mutanten wurden ebenfalls über eine PCR-Amplifikation hergestellt und in pCRII-TOPO zwischenkloniert. Nach Restriktion mit *EcoRI* und *PacI* wurden die verschiedenen cDNS-Bereiche in den pACT2-Vektor ligiert.

Abbildung 3.4 zeigt eine schematische Darstellung der verschiedenen OFD1-Mutanten, die hergestellt wurden, sowie ihre Bezeichnung. Weiterhin sind die verschiedenen Domänen des Proteins dargestellt. OFD1 enthält ein LisH-Domäne und fünf Coiled-coil-Domänen [Conciliis et al., 1998]. Die LisH-Domäne wird in vielen eukaryotischen Proteinen gefunden und vermittelt Dimerisierung und Tetramerisierung. Zudem führen Mutationen in dieser Domäne zu einer falschen Lokalisation des Proteins [Gerlitz et al., 2005]. Coiled-coil-Domänen dagegen ermöglichen Protein-Protein-Interaktionen. In OFD1 erfüllen sie zudem eine Rolle bei der Lokalisation des Proteins an die Zentrosome [Romio et al., 2004].

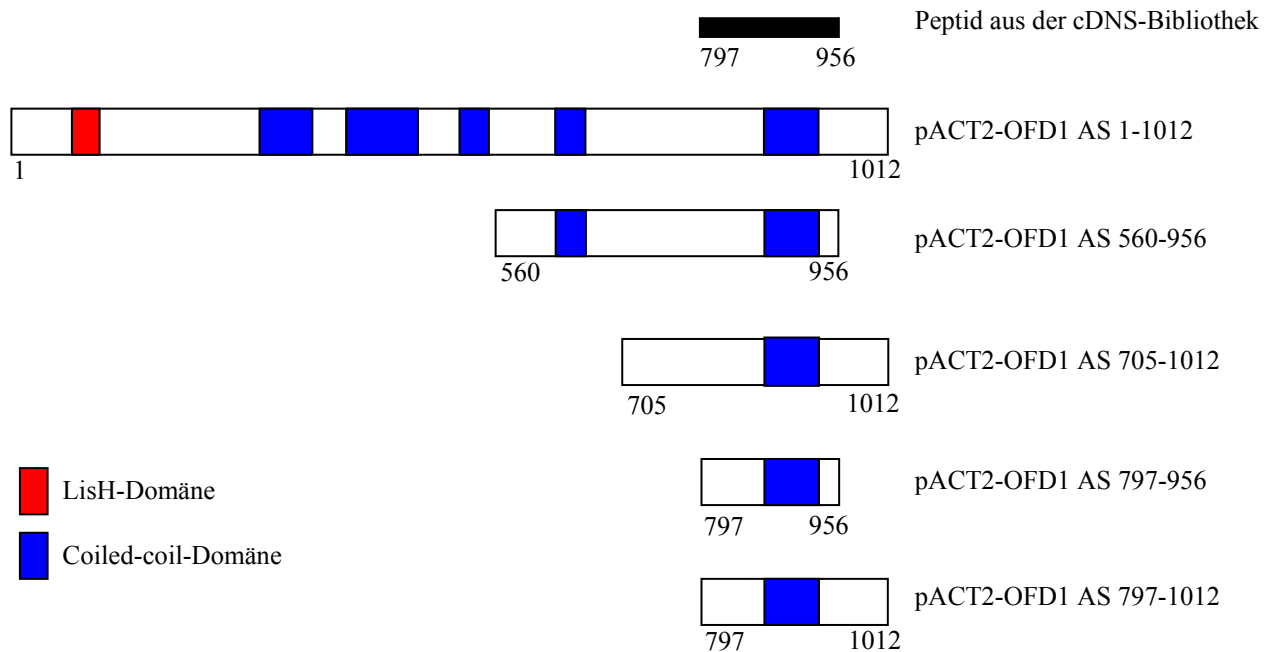


Abb. 3.4: Schematische Übersicht der OFD1-Mutanten

Es wurden fünf verschiedene Fusionskonstrukte der OFD1-cDNS Fragmente und der Aktivierungsdomäne von GAL4 hergestellt. Das Schema zeigt die resultierenden Proteine (Aktivierungsdomäne von GAL4 nicht gezeigt) und deren Domänen. Die Zahlen beziehen sich auf die Anfangs- und End-Aminosäuren der jeweilige OFD1-Fragmente. Die rote Region symbolisiert die LisH-Domäne und die blaue Region die Coiled-coil-Domäne.

3.2 ONPG-Test

Die verschiedenen OFD1-Mutanten, sowie die vollständige OFD1-cDNS wurden jeweils mit dem C-Terminus von Polyduktin in *S. cerevisiae* AH109 kotransformiert. Die Transformanten wurden anschließend auf niedrig-stringentem Medium angezogen. Schließlich wurde ein ONPG-Test durchgeführt. Die Ergebnisse des Tests sind in Abbildung 3.5 dargestellt. Weder die Kotransformation des gesamten OFD1-Proteins, noch die der verschiedenen Mutanten hatte eine β -Galactosidase-Aktivität zur Folge, die über der Negativkontrolle lag.

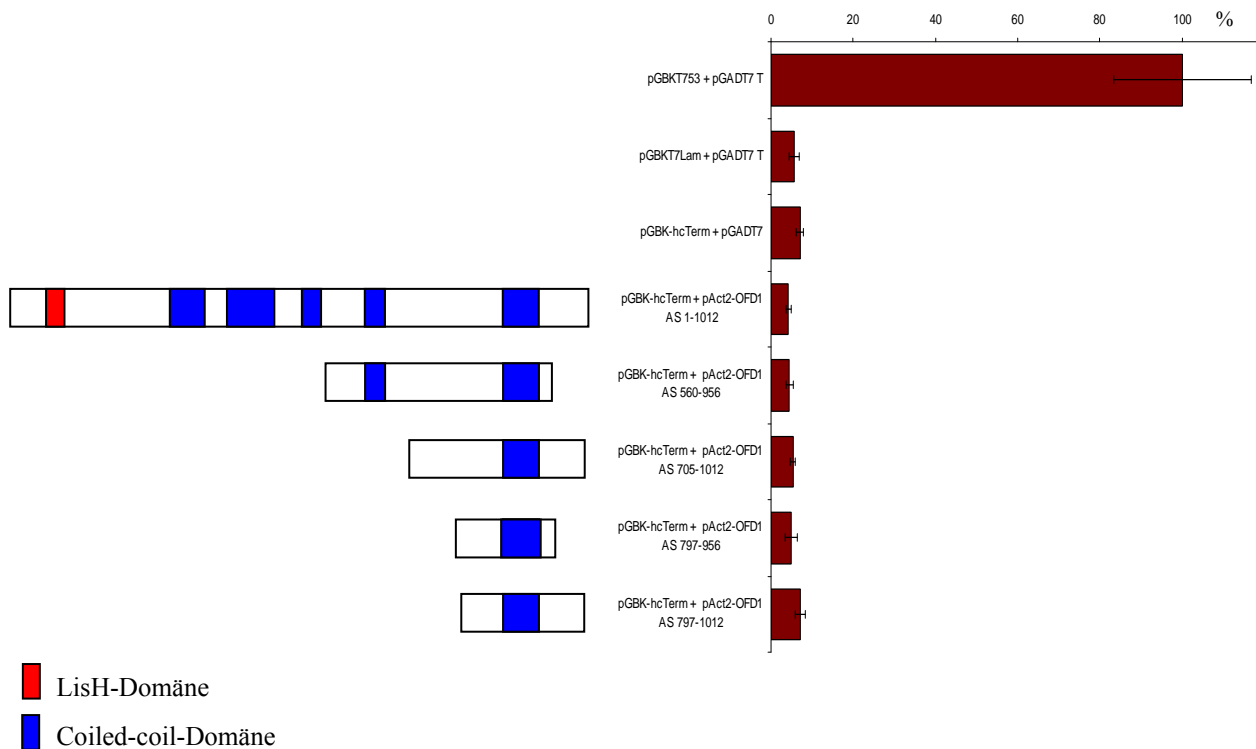


Abb. 3.5: ONPG-Test zum Nachweis der potentiellen Interaktion der OFD1-Mutanten mit dem C-Terminus von Polyduktin

Die links dargestellten GAL4-OFD1-cDNS-Fusionskonstrukte wurden mit pGBK-hcTerm in *S. cerevisiae* AH109 kotransformiert und ihre Interaktionen mittels eines ONPG-Tests ermittelt. Als Positivkontrolle diente murines p53 mit SV40 “Large-T”-Antigen welches gleich 100 % gesetzt wurde, alle anderen Werten sind relativ zur Positivkontrolle angegeben. Als Negativkontrolle wurde humanes Lamin C mit dem SV40 “Large-T”-Antigen kotransformiert. Zur Überprüfung möglicher Autoaktivierung wurde der C-Terminus von Polyduktin mit dem pGADT7-Vektor kotransformiert.

Die roten Balken stellen die jeweilige relative β -Galactosidase-Aktivität dar. Die rote Region symbolisiert die LisH-Domäne und die blaue Region die Coiled-coil-Domäne. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung beziehen sich jeweils auf zwei unabhängige Versuche in Triplikaten.

Obwohl OFD1 in der Niere exprimiert ist und als putativer Interaktionspartner interessant wäre, konnte im ONPG-Test keine Interaktion mit dem C-Terminus von Polyduktin nachgewiesen werden. Spätere Homologievergleiche mit verfügbaren Datenbanken zeigten, dass der von RZPD erworbene Klon IRAMP995O172Q2 eine Deletion von 40 Aminosäuren aufweist. Diese Deletion betrifft die Aminosäuren 313 bis 352 und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich in diesem Bereich die Interaktionsoberfläche befindet.

4. Untersuchung der potentiellen Interaktion zwischen Polyduktin und NPR1

4.1 Klonierung verschiedener NPR1-Mutanten

Um eine mögliche Interaktion zwischen NPR1 und Polyduktin zu prüfen und die Region der Interaktion einzugrenzen, wurden verschiedene NPR1-Mutanten kloniert. Hierzu wurde der cDNS-Klon IRAKp961A12133Q2 vom RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH) erworben.

Mittels PCR wurden verschiedene Bereiche der cDNS mit Hilfe der Oligonukleotide „NPR1 AS 705 for“ und „NPR1 AS 1010 rev“; „NPR1 AS 763 for“ und „NPR1 AS 1061 rev“; „NPR1 AS 985 for“ mit „NPR1 AS 1010 rev“, sowie „NPR1 AS 985 for“ mit „NPR1 AS 1061 rev“ amplifiziert. Die Fragmente wurden nach der Amplifikation in den pCRII-TOPO-Vektor ligiert. Durch Restriktion mit den Enzymen *EcoRI* und *XhoI* wurde der cDNS-Bereich aus pCRII-TOPO herausgeschnitten und in den pACT2-Vektor ligiert, so dass jeweils ein Fusionsprotein aus der NPR1-Mutante und der Aktivierungsdomäne von GAL4 kodiert wurde.

Eine schematische Darstellung der verschiedenen Mutanten, sowie ihre Bezeichnung ist Abb. 3.6 zu entnehmen. Zudem sind die verschiedenen Domänen des Proteins angegeben. NPR1 hat eine Transmembrandomäne. Der extrazelluläre N-Terminus bildet einen ligandenbindende Domäne, wohingegen der cytoplasmatische Teil eine Kinase-Homologie-Domäne, eine Coiled-coil-Domäne und eine Guanylyl-cyclase-Domäne enthält.

Der Guanylyl-cyclase-Domäne katalysiert die Bildung von cyclischem GMP. Diese katalytische Aktivität wird durch die Kinase-Homologie-Domäne reguliert, welche eine Konformationsänderung nach Ligandenbindung hervorruft. Die Coiled-coil-Domäne ermöglicht eine Proteindimerisierung, die essentiell für die katalytische Aktivität ist [zusammengefasst in: Kuhn, 2003].

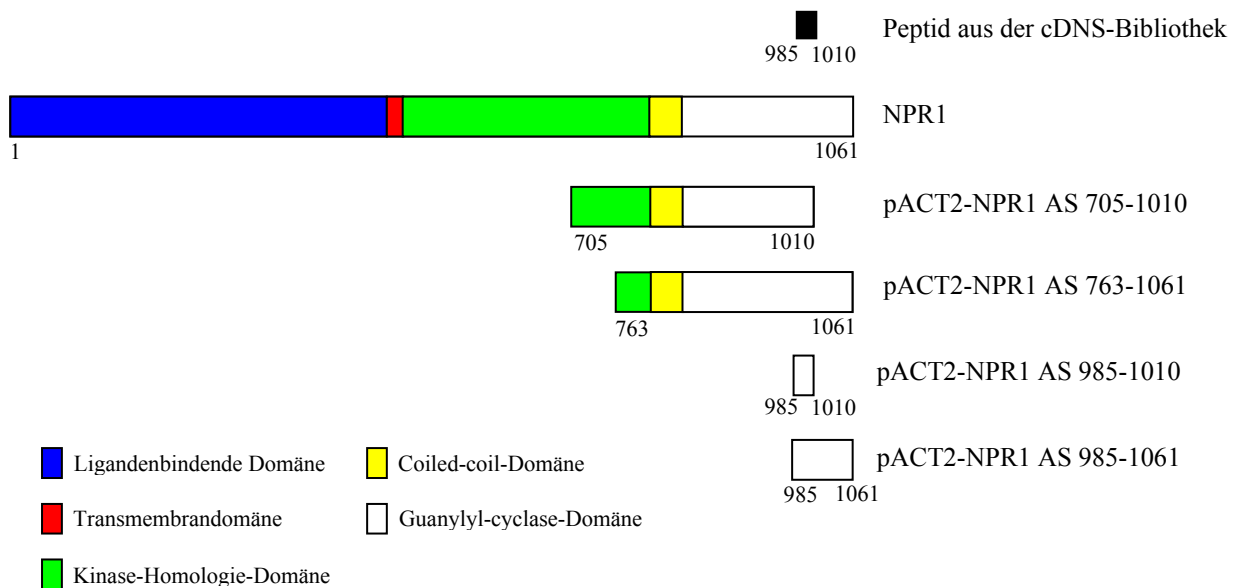


Abb. 3.6: Schematische Darstellung der NPR1-Mutanten

Dargestellt sind das komplette NPR1-Protein mit den verschiedenen Domänen, sowie die verschiedenen Mutanten, die hergestellt wurden (GAL4-Aktivierungsdomäne nicht gezeigt). Die Zahlen entsprechen der Anfangs- und End-Aminosäure der NPR1-Fragmente. Die Domänen sind farblich markiert und in der Abbildung genannt.

4.2 β -Galactosidase-Aktivität

Die verschiedenen Mutanten wurden jeweils mit dem C-Terminus von Polyduktin in *S. cerevisiae* AH109 kotransformiert. Nach der Transformation wurden die Klone auf niedrig-stringentem Medium kultiviert. Sowohl der β -Galactosidase-Filter-Test als auch der ONPG-Test (siehe Abb. 3.7) ergab, dass für die Fusionsproteine eine gegenüber der Negativkontrolle signifikant erhöhte β -Galactosidase-Aktivität nachweisbar war.

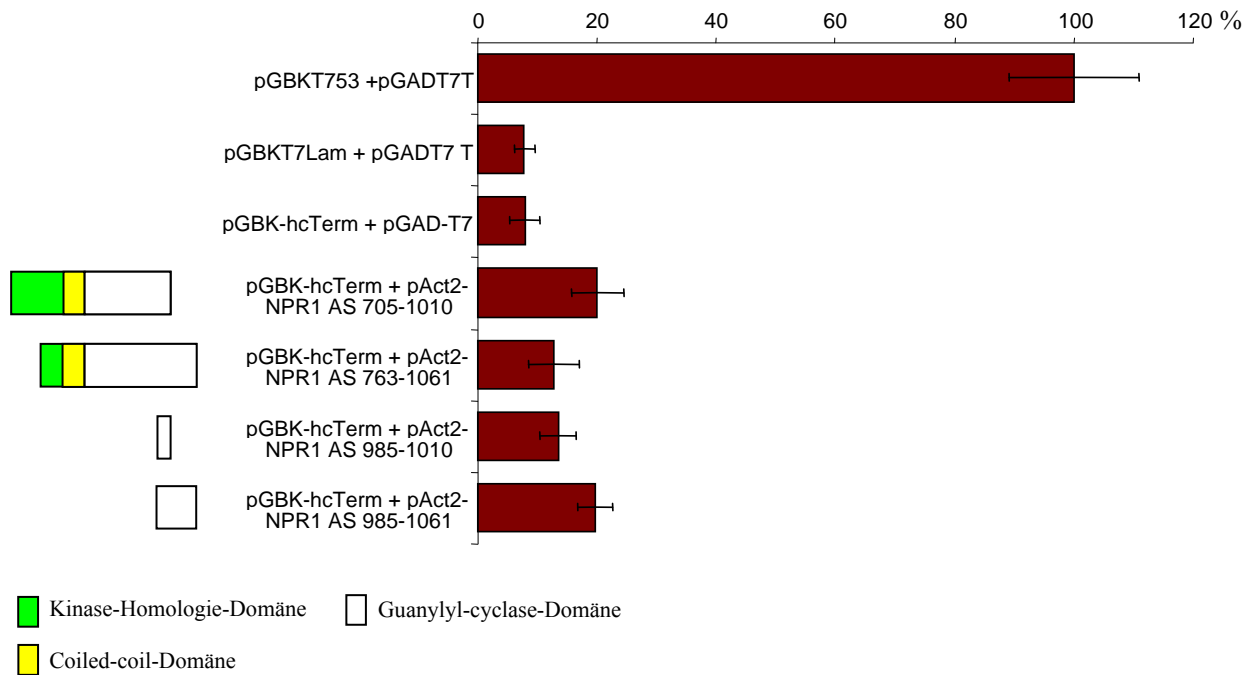


Abb. 3.7: ONPG-Test zum Nachweis der Interaktion zwischen den NPR1-Mutanten und dem C-Terminus von Polyduktin

Graphische Darstellung der gemessenen β -Galactosidase-Aktivität. Die links schematisch dargestellten NPR1-Mutanten wurden mit dem C-Terminus von Polyduktin in *S. cerevisiae* AH109 kotransformiert und auf niedrig-stringentem Medium angezogen. Anschließend wurde ein ONPG-Test durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde die Interaktion zwischen murinem p53 und SV40 "Large-T"-Antigen verwendet, welche 100 % gesetzt wurde. Alle andere Angaben sind relativ zur Positivkontrolle angegeben. Als Negativkontrolle fungierte humanes Lamin C mit SV40 "Large-T"-Antigen. Zur Überprüfung der Autoaktivierung wurde pGBK-hcTerm mit pGADT7 kotransformiert.

Rote Balken stellen die jeweilige relative β -Galactosidase-Aktivität dar. Die verschiedenen Domänen sind farbig markiert und in der Abbildung genannt. Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich auf zwei unabhängige Experimente in Triplikaten.

Alle Fusionsproteine zeigen im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikant höhere β -Galactosidase-Aktivität, so auch das Fusionsprotein das die Aminosäuren 985 bis 1010 umfasst, die dem aus der cDNS-Bibliothek isolierten Peptid entsprechen. Die Aminosäuren 985 bis 1061 umfassen einen Teil der Guanylyl-cyclase-Domäne. Dies zeigt, dass weder die ligandenbindende Domäne, noch die Kinase-Homologie-Domäne oder die Coiled-coil-Domäne für die Bindung essentiell sind.

Diese Daten zeigen, dass die Aminosäuren 985 bis 1010 von NPR1 ausreichend sind für eine Interaktion mit dem C-Terminus von Polyduktin.

4.3 α -Galactosidase-Aktivität

Um die schwache Interaktion in dem β -Galactosidase-Test zu bestätigen wurde ein α -Galactosidase-Aktivitäts-Test durchgeführt. Im Gegensatz zur β -Galactosidase wird α -Galactosidase von Hefen ins Medium abgegeben. Dies ermöglicht die Untersuchung der α -Galactosidaseexpression direkt auf den Agarplatten. Die NPR1-Mutanten wurden mit pGBK-hcTerm in *S. cerevisiae* AH109 kotransformiert und anschließend auf mittel-stringentem Medium kultiviert (Abb. 3.8). Die beiden Fusionsproteine, welche die Aminosäure 985 bis 1010 bzw. 985 bis 1061 von NPR1 enthalten, zeigen eine deutliche Blaufärbung. Bei den beiden anderen NPR1-Fusionsproteinen ist eine leichte Blaufärbung im Vergleich zur Negativkontrolle zu erkennen.

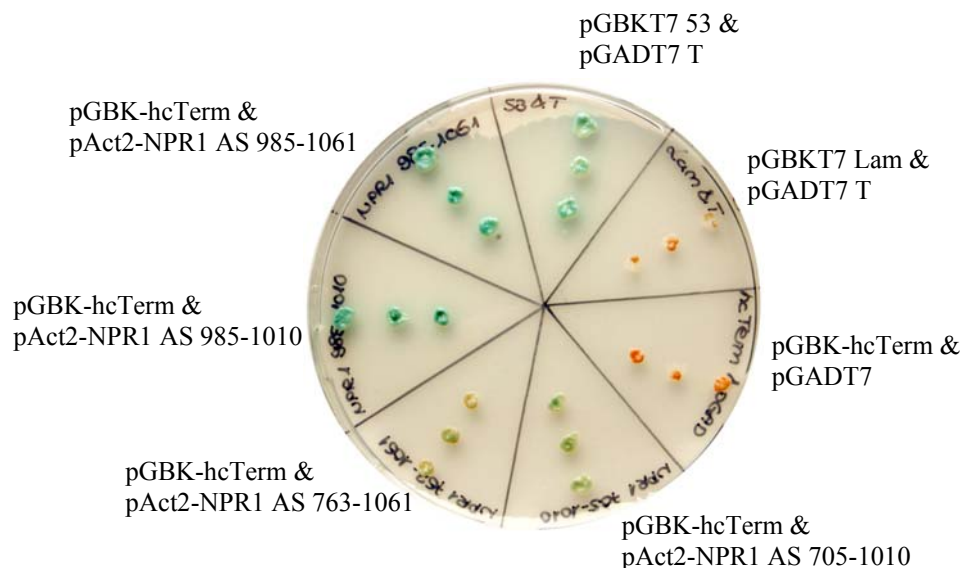


Abb. 3.8: Nachweis der Interaktion zwischen den NPR1-Mutanten und dem C-Terminus von Polyduktin mittels einen α -Galactosidase-Aktivitäts-Test

NPR1-Mutanten wurden mit pGBK-hcTerm in *S. cerevisiae* AH109 kotransformiert und anschließend auf mittel-stringentes Medium mit X- α -Gal überimpft. Als Positivkontrolle diente die Interaktion zwischen murinem p53 und SV40 "Large-T"-Antigen, als Negativkontrolle humanes Lamin C und SV40 "Large-T"-Antigen. Die Autoaktivierung wurde kontrolliert, indem pGBK-hcTerm mit pGADT7 kotransformiert wurde.

Die Daten der β - und α -Galactosidase-Tests sind im Einklang miteinander. Sie bestätigen, dass die Aminosäuren 985 bis 1010 von NPR1 ausreichend sind um eine Interaktion mit dem C-Terminus von Polyduktin einzugehen.

5. Untersuchung der potentiellen Interaktion zwischen Polyduktin und C7

5.1 Klonierung der kompletten C7-cDNS und einer Mutanten

Die Aminosäuren 645 bis 843 von C7, die sich in Klon 11-23 befanden, zeigten eine starke β -Galactosidaseexpression im Hefe-zwei-Hybrid-Screen (siehe Abb. 3.3). Um die Interaktion von C7 mit Polyduktin zu bestätigen und auf eine bestimmte Proteinregion einzugrenzen, wurde die komplette cDNS von C7, sowie der Bereich, der die Aminosäuren 335 bis 843 kodiert, amplifiziert. Hierzu wurde der cDNS-Klon IRATp970E0794D6 vom RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH) verwendet.

Mit den Oligonukleotiden „C7 AS 1 for“ und „C7 AS 843 rev“ wurde mittels PCR die komplette cDNS von C7 amplifiziert und in den pCRII-TOPO-Vektor ligiert. Die Oligonukleotide „C7 AS 335 for“ und „C7 AS 843 rev“ wurden verwendet, um die cDNS, die für die Aminosäuren 335 bis 843 kodiert, zu amplifizieren und ebenfalls in den pCRII-TOPO-Vektor zu klonieren. Mit dem Oligonukleotid „EcoRI-PacI-XhoI if for und rev“ wurde zu diesem Zweck in den pACT2-Vektor eine *PacI*-Schnittstelle eingefügt. Nach Ausschneiden der cDNS-Bereiche aus pCRII-TOPO mit den Enzymen *PacI* und *XhoI* wurden diese im Leserahmen in den pACT2-Vektor ligiert.

Abb. 3.9 zeigt die verschiedenen Konstrukte, sowie die Proteindomänen, die sie umfassen. C7 enthält zwei Thrombospondin-Typ1-Wiederholungen [Hobart et al., 1995]. Eine Rolle für diese Domäne wurde bei der Apoptose [Guo et al., 1997] und der Inhibition der Angiogenese [Iruela-Arispe et al., 1999] nachgewiesen. Weiterhin hat es eine LDLa (low density lipoprotein)-Domäne, die ein Bindestelle für Calcium und LDL darstellt. Die Membranangriffkomplexes/Perforin-Domäne ist eine Domäne, die den verschiedenen Komponenten des Membranangriffkomplexes gemeinsam ist. Das Protein enthält zudem zwei „Short complement like repeats“. Diese Domänen kommen bei Komplementproteinen und Adhäsionsproteinen vor. Zusätzlich kommen zwei Faktor-I-Membranangriffskomplex-Domänen vor [Hobart et al., 1995].

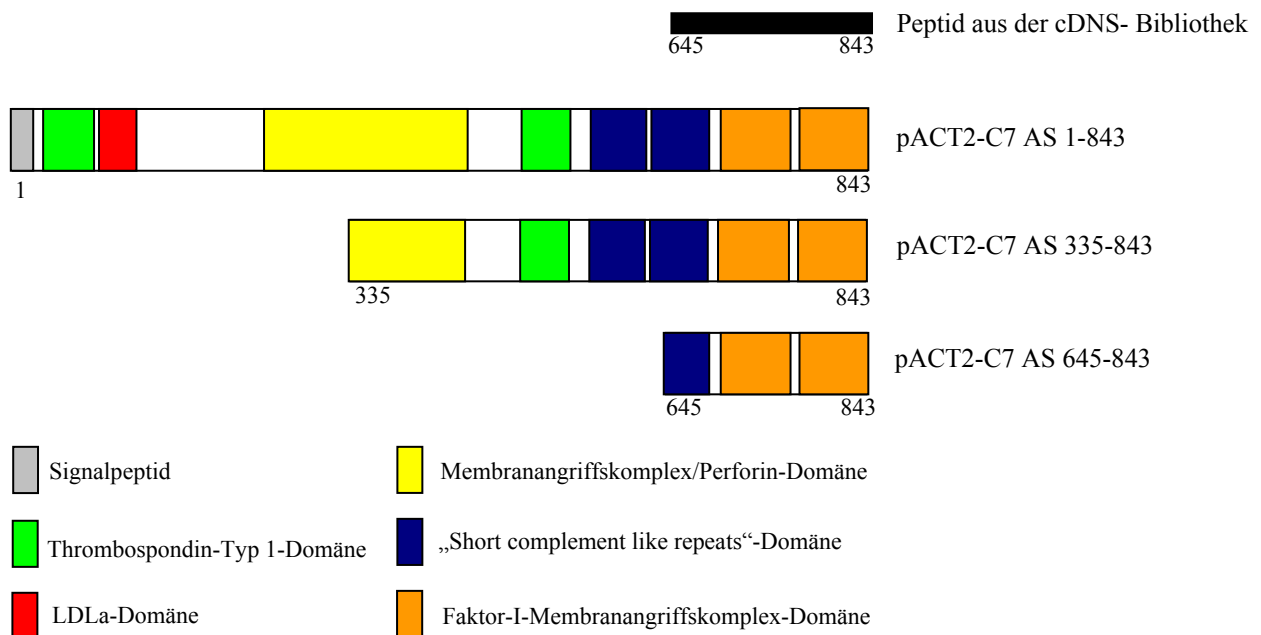


Abb. 3.9: Schematische Darstellung der C7-Mutanten und deren Proteindomänen

Es wurde zwei verschiedene Fusionskonstrukte von C7-cDNS Fragmenten und der Aktivierungsdomäne von GAL4 hergestellt. Das Konstrukt „pACT2-C7 AS 645-843“ entspricht der cDNS, die aus Klon 11-23 isoliert wurde. Das Schema zeigt die resultierenden Proteine (Aktivierungsdomäne von GAL4 nicht gezeigt) und deren Domäne. Die Zahlen entsprechen der ersten bzw. letzten Aminosäure der jeweilige C7-Fragmente. Die verschiedenen Domänen sind farblich markiert und in der Abbildung genannt.

5.2 β -Galactosidase-Aktivität

Um die β -Galactosidase-Aktivität zu überprüfen wurden die C7-Mutanten jeweils mit dem C-Terminus von Polyduktin in *S. cerevisiae* AH109 kotransformiert und auf niedrig-stringentem Medium kultiviert. Anschließend wurde ein β -Galactosidase-Filter-Test und ein ONPG-Test (siehe Abb. 3.10) durchgeführt.

Das Fusionsprotein mit den Aminosäuren 645 bis 843 von C7, die die beiden Faktor-I-Membranangriffskomplex-Domänen und einen Teil der letzten „short complement like repeats“-Domäne enthält, führte zu einer hohen β -Galactosidase-Aktivität, die etwa 60 % der Positivkontrolle entsprach. Des Weiteren zeigte das C7-Fragment mit den Aminosäuren 335 bis 843 von C7 etwa die doppelte Aktivität der Negativkontrolle. Dieses Fragment umfasst einen Teil der Membranangriffskomplex/Perforin-Domäne, einen Teil der zweiten Thrombospondin-Typ-I-Domäne und sowohl beide „short complement like repeats“-Domänen als auch beide Faktor-I-Membranangriffskomplex-Domänen. Im Gegensatz dazu bewirkte das vollständige C7 keine erhöhte Aktivität. Dies bedeutet, dass die LDLa-Domäne so wie die beide Thrombospondin-Typ-I-Domänen, der Membranangriffskomplex/Perforin-

Domäne und der erste der „short complement like repeats“-Domänen nicht für eine Bindung mit Polyduktin benötigt werden.

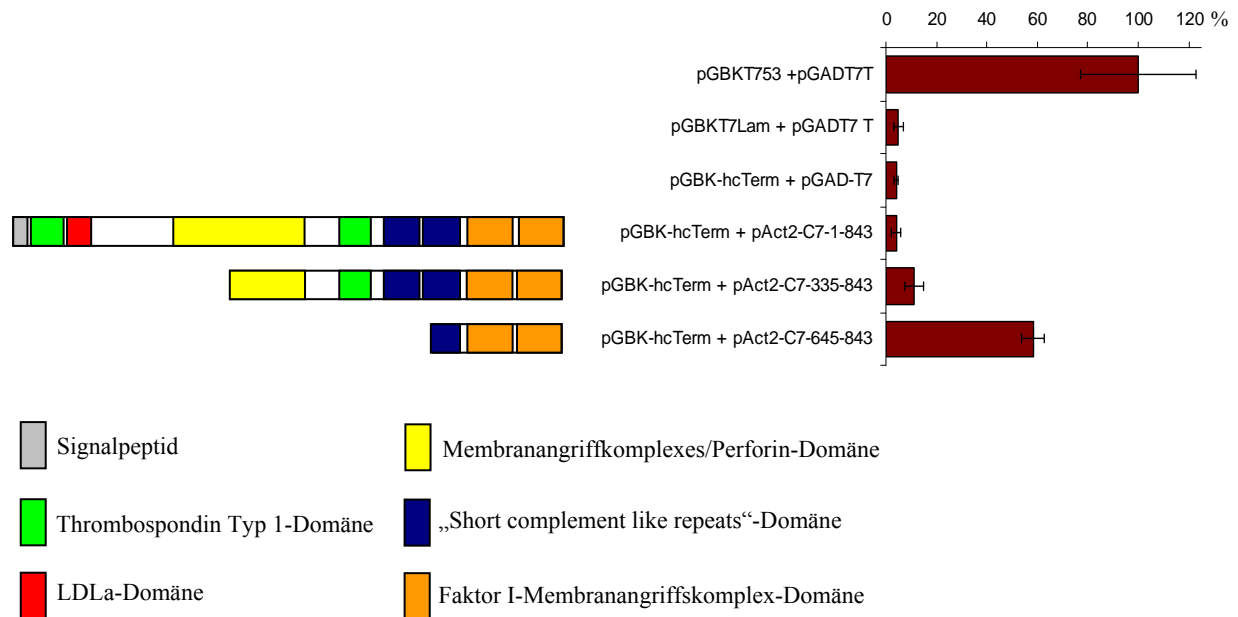


Abb. 3.10: ONPG-Test zum Nachweis der Interaktion zwischen den C7-Mutanten und dem C-Terminus von Polyduktin

Ein ONPG-Test wurde mit Hefeklonen durchgeführt, welche mit pGBK-hcTerm und den C7-Mutanten oder der kompletten C7-cDNS kotransformiert wurden. Als Postivkontrolle wurde die Interaktion zwischen murinem p53 und SV40 „Large-T“-Antigen verwendet. Diese wurde 100 % gesetzt und alle andere Ergebnisse relativ hierzu angegeben. Als Negativkontrolle diente humanes Lamin C und SV40 „Large-T“-Antigen. Weiterhin wurde pGBK-hcTerm mit pGADT7 kotransformiert als Kontrolle für Autoaktivierung.

Die roten Balken stellen die jeweilige relative β -Galactosidase-Aktivität dar. Die verschiedenen Proteindomänen sind farblich markiert und in der Abbildung genannt. Mittelwert und Standardabweichung beziehen sich auf zwei unabhängige Experimente. Dabei wurden zwei unabhängige Hefetransformanten jeweils in Triplikaten getestet.

Die Daten der β -Galactosidase-Test zeigen, dass eine Interaktion von C7 mit Uromodulin stattfindet. Diese Interaktion wird über die Aminosäuren 645 bis 843 von C7 vermittelt.

5.3 α -Galactosidase-Aktivität

Um die Interaktion zwischen C7 und dem C-Terminus von Polyduktin zu verifizieren wurde die Expression eines weiteren Reportergens, MEL1, geprüft. Hierzu wurde ein α -Galactosidase-Aktivitäts-Test durchgeführt. Nach Kotransformation der C7-Mutanten mit dem C-Terminus von Polyduktin wurden die Klone auf mittel-stringentes Medium ausgestrichen, welches X- α -Gal enthielt (siehe Abb. 3.11). Die Klone, welche mit der kompletten cDNS von C7 und Polyduktin transformiert wurden, waren nicht in der Lage, α -

Galactosidase zu exprimieren. Eine deutliche Blaufärbung war bei den Klonen, welche für die Aminosäure 335 bis 843 bzw. 645 bis 843 von C7 kodieren, nachzuweisen.

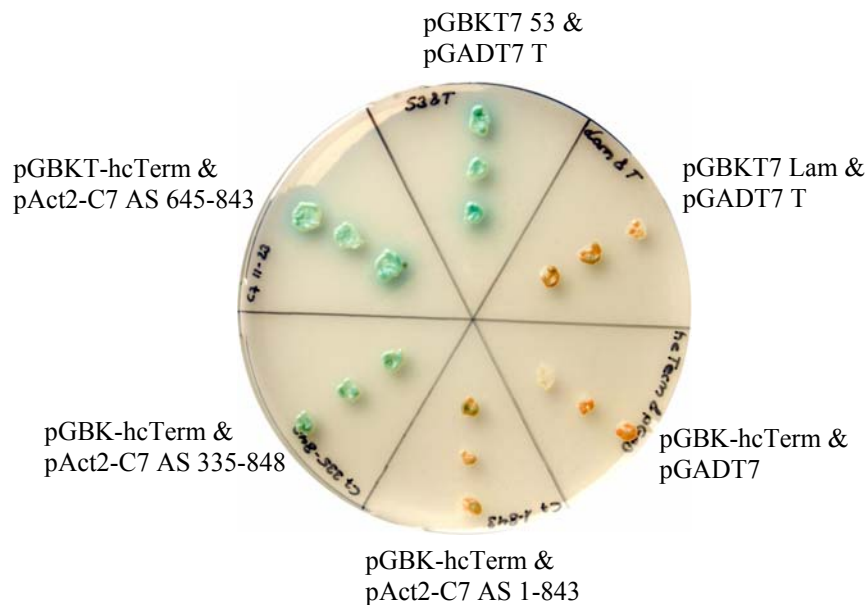


Abb. 3.11: Nachweis der Interaktion zwischen den C7-Mutanten und dem C-Terminus von Polyduktin mittels ein α -Galactosidase-Aktivitäts-Test

Eine Kotransformation der C7-Mutanten und pGBK-hcTerm wurde in *S. cerevisiae* AH109 vorgenommen und die Klone anschließend auf mittel-stringentes Medium mit X- α -Gal überimpft. Als Positivkontrolle diente die Interaktion zwischen murinem p53 und SV40 "Large-T"-Antigen, als Negativkontrolle humanes Lamin C und SV40 "Large-T"-Antigen. Autoaktivierung wurde kontrolliert, indem pGBK-hcTerm mit pGADT7 kotransformiert wurde.

Übereinstimmend mit dem quantitativen ONPG-Test, konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren 645 bis 843 von C7 ausreichend für einen Interaktion mit dem C-Terminus von Polyduktin sind.

5.4 GST-Proteininteraktionsstudien

Um die Interaktion zwischen C7 und Polyduktin zu überprüfen, wurden GST-Proteininteraktionsstudien durchgeführt. Hierzu wurde zunächst ein Startcodon und die Sequenz für ein Myc-Epitop in das Expressionsplasmid pCMX mittels eines Oligonukleotids eingebracht. Anschließend wurde die cDNS, die für die Aminosäuren 645 bis 843 von C7

kodiert, mit *PacI* und *XhoI* aus pACT2-C7 AS 645-843 ausgeschnitten und in diesen pCMX-Myc-*PacI*-Vektor ligiert. Das resultierende Plasmid wurde als pCMX-Myc-C7 AS 645-843 bezeichnet. Mit pCMX-Myc-C7 AS 645-843 wurde eine gekoppelte *in vitro* Transkriptions/Translationsreaktion in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Methionin durchgeführt. Ein GST-Fusionsprotein mit den Aminosäuren 3880 bis 4074 von Polyduktin wurde an Sepharose immobilisiert und mit dem Translatat inkubiert. Zur Kontrolle wurde GST alleine immobilisiert und mit dem Translatat inkubiert.

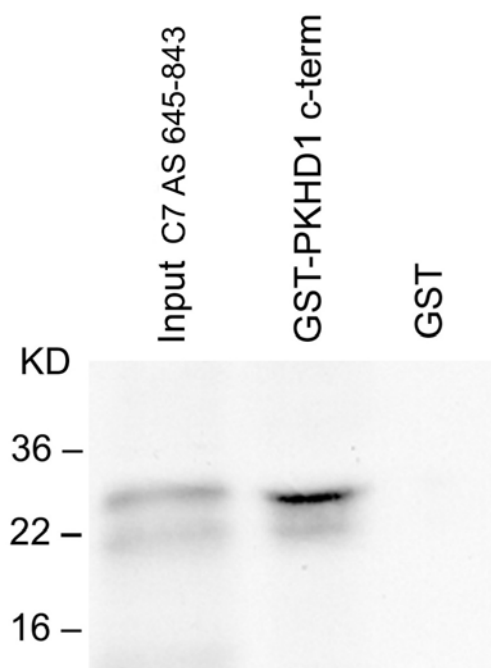


Abb. 3.12: Nachweis der Interaktion von C7 AS 645-843 mit dem C-Terminus von Polyduktin

Ein GST-Fusionsprotein der Aminosäuren 3880 bis 4074 von Polyduktin (GST-PKHD1-c-term) bzw. GST alleine (GST) wurde an Sepharose gekoppelt und mit dem radioaktiv markierten C7-Fragment (Aminosäure 645 bis 843) inkubiert. Es wurden gleiche Proteinmengen des Fusionsproteins und von GST immobilisiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte auf einem 15 % PAA-Gel, Exposition 5 Tage.

Die Zahlen geben das Molekulargewicht in Kilodalton (KD) an. Auf den Gel wurden 10 % des ^{35}S markierten Proteins, (Input C7 AS 645-843) zum Größenvergleich aufgetragen. Die Abbildung ist exemplarisch für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

In Übereinstimmung mit den *in vivo* Hefeexperimenten bindet das C7-Proteinfragment, das die Aminosäuren 645 bis 843 umfasst, *in vitro* an den C-Terminus von Polyduktin. Die Protein-Protein-Interaktion wird spezifisch durch die C7 Aminosäuren 645 bis 843 und nicht durch den GST-Anteil im Fusionsprotein hervorgerufen, da das GST-Protein nicht mit C7 interagiert.

6. Untersuchung der potentiellen Interaktion zwischen Polyduktin und Uromodulin

6.1 Klonierung der kompletten Uromodulin-cDNS und verschiedener Mutanten

Zur Klonierung verschiedener Uromodulin-Mutanten wurde der cDNS-Klon IRAUp969G0689D6, der die komplette Uromodulin-cDNS enthält, vom RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH) bezogen.

Mit den Oligonukleotiden „UMOD AS 1 for“ und „UMOD AS 640 rev“ wurde die vollständige UMOD-cDNS amplifiziert. Mit Hilfe folgender Oligonukleotidpaare wurden verschiedene Mutanten hergestellt: „UMOD AS 158 for“ und „UMOD AS 444 rev“; „UMOD AS 298 for“ und „UMOD AS 557 rev“; „UMOD AS 419 for“ und „UMOD AS 444 rev“ sowie „UMOD AS 419 for“ und „UMOD AS 640 rev“.

Alle cDNS-Bereiche wurden in pCRII-TOPO kloniert und anschließend mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* ausgeschnitten, und in pACT2 hinter der Aktivierungsdomäne von GAL4 in den Leserahmen ligiert.

Eine schematische Darstellung der verschiedenen Uromodulin-Mutanten, des vollständigen Proteins und der Proteindomänen, sowie die Bezeichnung der hergestellten Plasmide ist in Abb. 3.13 dargestellt. Uromodulin hat vier verschiedene EGF-ähnliche Domänen. Die EGF-Domäne enthält sechs konservierte Cys-Reste, die Disulfidbrücken bilden [Wolf et al., 2003b]. Eine weitere Domäne, deren Funktion noch unbekannt ist, enthält acht Cys-Reste, die vermutlich auch Disulfidbrücken bilden [Yang et al., 2004]. Als letzte Domäne besitzt Uromodulin eine Zona Pellucida-Domäne. Diese ermöglicht dem Protein Filamente zu bilden [Jovine et al., 2002].

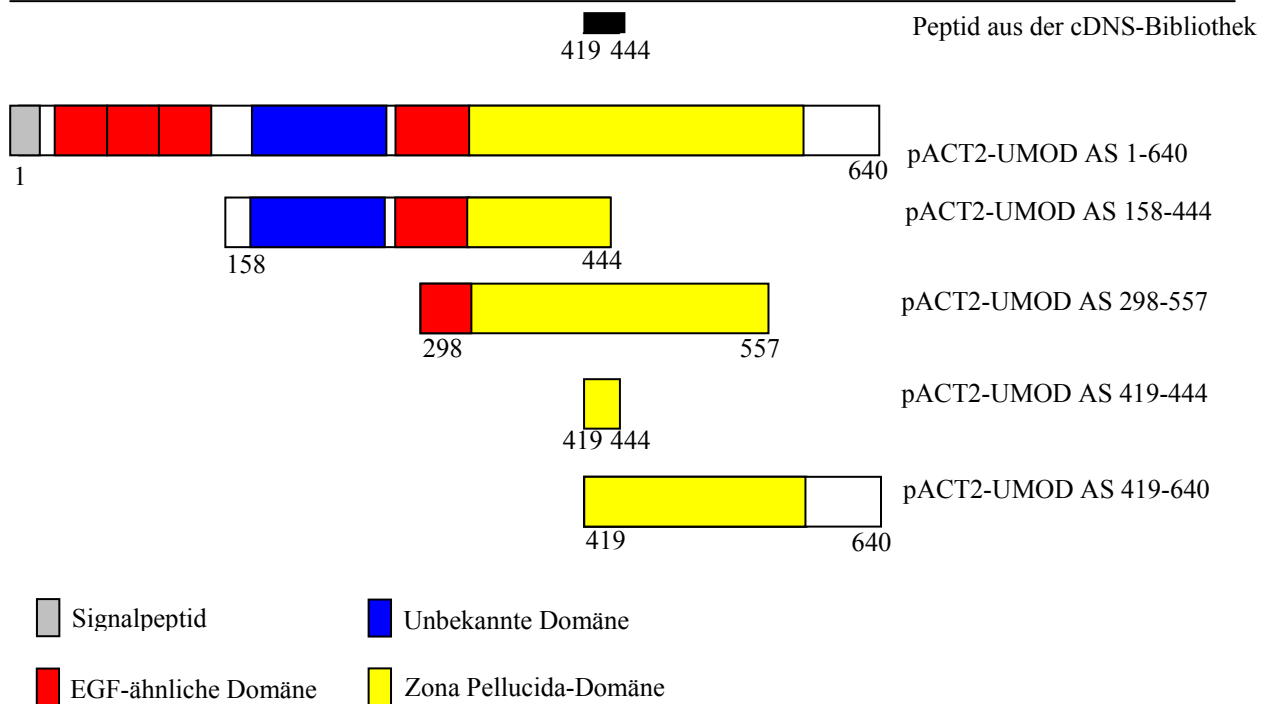


Abb. 3.13: Schematische Darstellung des kompletten Uromodulin Proteins sowie verschiedener Mutanten
Gezeigt ist das komplette Uromodulin und dessen Proteindomänen. Außerdem sind die verschiedenen hergestellten Uromodulin-Mutanten und die Proteindomänen, die sie umfassen, dargestellt (Aktivierungsdomäne von GAL4 nicht gezeigt). Die Anfangs- bzw. End-Aminosäure der jeweilige Uromodulin-Fragmente sind mit Zahlen angegeben. Die verschiedenen Domänen des Proteins sind farbig markiert und in der Abbildung genannt.

6.2 β -Galactosidase-Aktivität

Für die Durchführung eines ONPG-Tests wurden die verschiedenen Mutanten jeweils gemeinsam mit dem C-Terminus von Polyduktin in *S. cerevisiae* AH109 kotransformiert. Die Transformanten wurden auf niedrig-stringentem Medium kultiviert.

Ein β -Galactosidase-Filter-Test und ein ONPG-Test (Abb. 3.14) wurden durchgeführt. Die Kotransformation von Polyduktin mit den Aminosäurebereichen 158 bis 444, 298 bis 557 und 419 bis 444 von Uromodulin ergab eine deutliche Interaktion, gemessen an der β -Galactosidase-Aktivität im Vergleich zur Negativkontrolle. Dabei fehlten Uromodulin AS 158-444 die ersten drei EGF-ähnlichen Domänen, sowie die GPI-Ankerstelle an Position 614. Uromodulin AS 298-557 fehlte neben den ersten drei EGF-ähnlichen Domänen und der GPI-Ankerstelle auch die zentrale Domäne des Uromodulin. Uromodulin AS 419-444 enthielt nur noch einen Teil der Zona Pellucida-Domäne. Die Aminosäuren 419 bis 640 von Uromodulin, die ein Teil der Zona Pellucida-Domäne und der GPI-Ankerstelle umfassen, hatten eine nur geringfügig erhöhte β -Galactosidase-Aktivität. Die vollständige cDNS von Uromodulin zeigt keine signifikante β -Galactosidase-Aktivität.

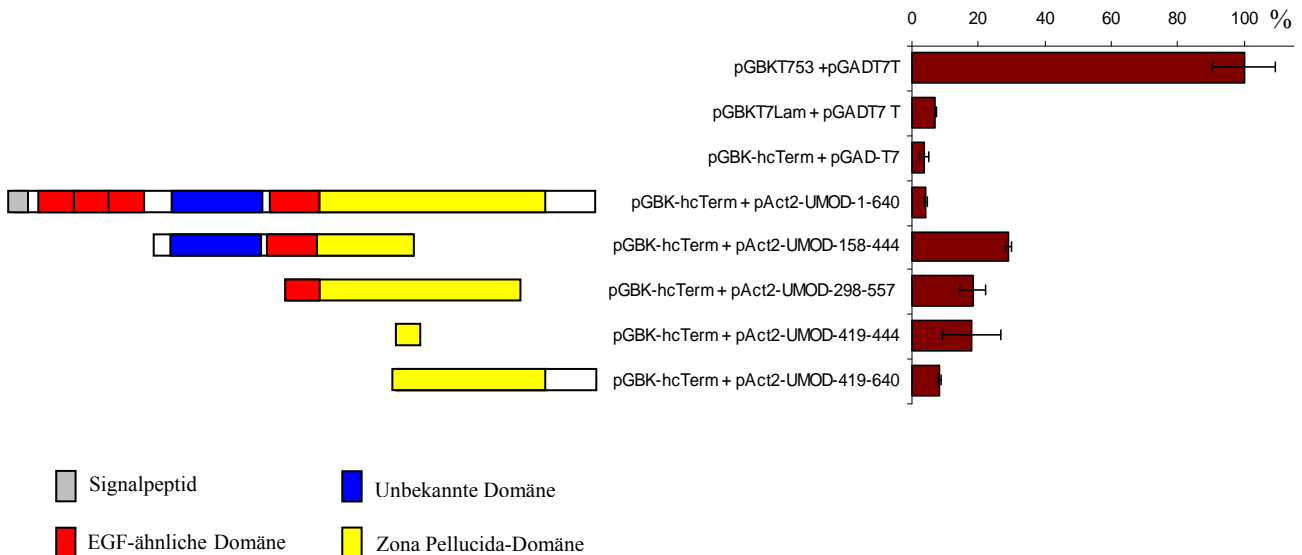


Abb. 3.14: ONPG-Test zum Nachweis der Interaktion zwischen den Uromodulin-Mutanten und dem C-Terminus von Polyduktin

Für die Durchführung des ONPG-Tests wurde *S. cerevisiae* AH109 mit den links schematisch dargestellten Uromodulin-Mutanten und pGBK-hcTerm kotransformiert. Als Positivkontrolle diente murines p53 mit SV40 "Large-T"-Antigen. Die Aktivität dieser Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt und alle anderen Werte relativ hierzu bezogen. Als Negativkontrolle wurde humanes Lamin C mit SV40 "Large-T"-Antigen verwendet. Zur Kontrolle der Autoaktivierung wurde pGBK-hcTerm mit pGADT7 kotransformiert.

Die roten Balken stellen die relative β -Galactosidase-Aktivität der jeweiligen Transformanten dar. Die verschiedenen Proteindomänen sind farbig markiert und in der Abbildung genannt. Mittelwert und Standardabweichung beziehen sich auf drei unabhängige Experimente. Dabei wurden zwei unabhängige Hefetransformanten jeweils als Triplikate getestet.

Die β -Galactosidase-Aktivitäts-Tests zeigen, dass eine starke Interaktion der Fusionsproteine, die die Aminosäuren 419 bis 444, 298 bis 557 und 158 bis 444 von Uromodulin enthalten, mit dem C-Terminus von Polyduktin stattfindet. Für das Fusionsprotein, das die Aminosäuren 419 bis 640 umfasst, wurde in Vergleich zu der Negativkontrolle eine signifikante Steigerung der β -Galactosidase-Aktivität nachgewiesen. Dieses Fusionsprotein zeigt somit ebenfalls eine Interaktion mit dem C-Terminus von Polyduktin. Diese Ergebnisse zeigen, dass weder die EGF-ähnliche Domäne, die zentrale Domäne, oder die GPI-Ankerstelle für eine Bindung an Polyduktin essentiell sind.

Mit diesen Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die Aminosäuren 419 bis 444 von Uromodulin ausreichend für eine Interaktion zwischen Uromodulin und dem C-Terminus von Polyduktin sind.

6.3 α -Galactosidase-Aktivität

Damit die Interaktion bestätigt wird, wurde außerdem die Expression weiterer Reportergene überprüft, indem ein α -Galactosidase-Aktivitäts-Test durchgeführt wurde. Für den α -Galactosidase-Test wurden die Uromodulin-Mutanten mit dem C-Terminus von Polyduktin in den Hefestamm *S. cerevisiae* AH109 kotransformiert und anschließend auf mittel-stringentem Medium mit X- α -Gal kultiviert.

Wie aus Abb. 3.15 zu entnehmen ist, ist bei den Klonen, die mit Polyduktin und den Uromodulin-Aminosäuren 158 bis 444, Aminosäuren 298 bis 557 und Aminosäuren 419 bis 444 kotransformiert wurden, eine deutliche α -Galactosidase-Aktivität zu erkennen. Eine schwache Aktivität war bei den Transformanten vorhanden, die neben Polyduktin die Aminosäuren 419 bis 640 von Uromodulin enthielten. Eine Kotransformation des C-Terminus von Polyduktin mit der kompletten cDNS von UMOD hatte keinen Effekt auf die α -Galactosidase-Aktivität.

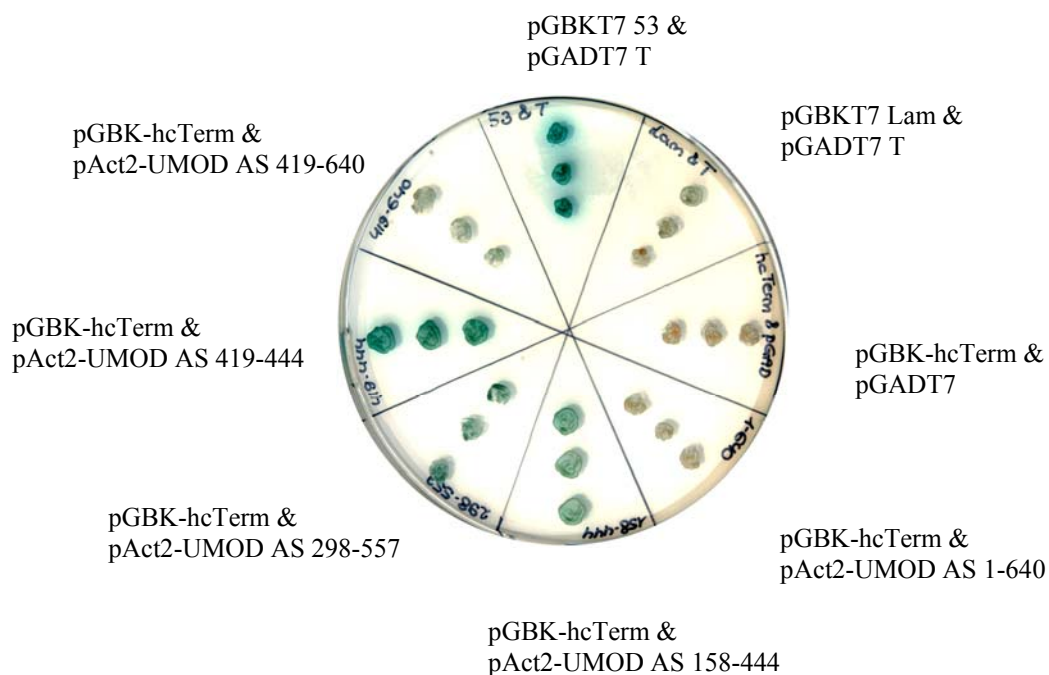


Abb. 3.15: Nachweis der Interaktion zwischen die Uromodulin-Mutanten und Polyduktin mittels ein α -Galactosidase-Aktivitäts-Test

Die verschiedenen UMOD-Mutanten wurden mit pGBK-hcTerm in *S. cerevisiae* AH109 kotransformiert und auf mittel-stringentes Medium mit X- α -Gal überimpft. Als Postivkontrolle diente die Interaktion zwischen murinem p53 und SV40 "Large-T"-Antigen, als Negativkontrolle wurde humanes Lamin C und SV40 "Large-T"-Antigen und als Kontrolle auf Autoaktivierung pGBK-hcTerm und pGADT7 kotransformiert.

Mittels den α -Galactosidase-Aktivitäts-Tests konnten die Ergebnisse des β -Galactosidase-Aktivitäts-Tests verifiziert werden. Eine Interaktion von dem C-Terminus von Polyduktin konnte mit den Fusionsproteinen, die die Aminosäuren 419 bis 444, 298 bis 557 und 158 bis 444 von Uromodulin enthalten, nachgewiesen werden. Eine schwächere Interaktion konnte für das Fusionsprotein von Uromodulin Aminosäuren 419 bis 640 gezeigt werden.

Diese Ergebnisse bestätigen somit, dass die Aminosäuren 419 bis 444 für eine Interaktion mit dem C-Terminus von Polyduktin ausreichen.

6.4 GST-Proteininteraktionsstudien

Um die Interaktion zwischen Uromodulin und Polyduktin zu verifizieren, wurde eine GST-Proteininteraktionsstudie durchgeführt. Hierzu wurden Expressionsplasmide hergestellt, um die verschiedenen Uromodulin-Mutanten *in vitro* zu translatieren. Zunächst wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* die cDNS-Bereiche der Mutanten aus den jeweiligen pCRII-TOPO-UMOD-Vektoren ausgeschnitten und in den pCMX-Myc-Vektor ligiert. Schließlich wurden die verschiedenen Mutanten in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Methionin *in vitro* transkribiert und translatiert.

Mit einem Molekulargewicht von ca. vier kDa war die Mutante pCMX-Myc-UMOD AS 419-444 zu klein, um eine Proteininteraktionsstudie durchzuführen, und wurde somit nicht verwendet.

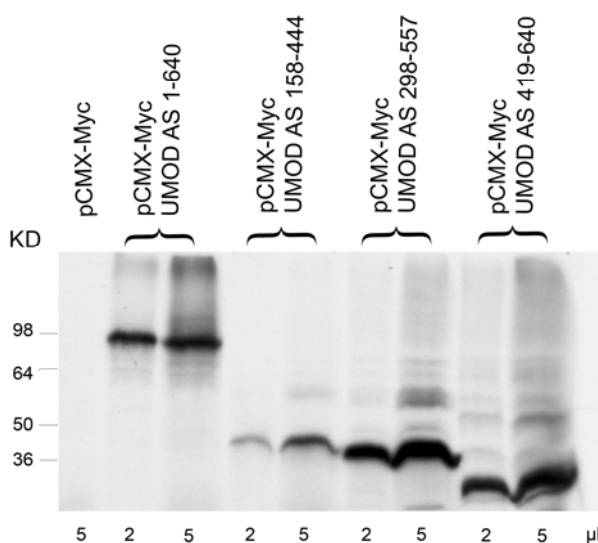


Abb. 3.16: *In vitro* Translation verschiedener Uromodulin-Mutanten

Die verschiedenen Mutanten wurden in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Methionin *in vitro* transkribiert und translatiert. Jeweils 2 bzw. 5 μ l der *in vitro* Translatate und 5 μ l des leeren pCMX-Myc-Vektors-Translatats wurden in einem 10 % PAA-Gel elektrophoretisch getrennt. Die Exponierung des Filmes erfolgte für 3 h. Alle hergestellten Konstrukte UMOD AS 1-640 (72 kDa), UMOD AS 158-444 (34 kDa), UMOD AS 298-557 (30 kDa) und UMOD AS 419-640 (26 kDa) wurden entsprechend ihrem Molekulargewicht translatiert.

Die Zahlen geben das Molekulargewicht in Kilodalton (KD) an.

Abbildung 3.16 zeigt, dass alle hergestellten Konstrukte pCMX-Myc-UMOD AS 1-640 (~72 kDa), pCMX-Myc-UMOD AS 158-444 (~ 34 kDa), pCMX-Myc-UMOD AS 298-557 (~ 30 kDa) und pCMX-Myc-UMOD AS 419-640 (~ 26 kDa) entsprechend ihrem errechneten Molekulargewicht translatiert werden.

Der Vektor pGEX-4T1-c-Term-PKHD1, welcher ein Fusionsprotein aus GST und den Aminosäuren 3880 bis 4074 von Polyduktin kodiert, wurde in *E. coli* transformiert und exprimiert. GST-PKHD1-c-Term, oder GST alleine, wurde an Sepharose gekoppelt und jeweils mit den radioaktiv markierten Uromodulin-Mutanten pCMX-Myc-UMOD AS 158-444 bzw. pCMX-Myc-UMOD AS 419-640 inkubiert.

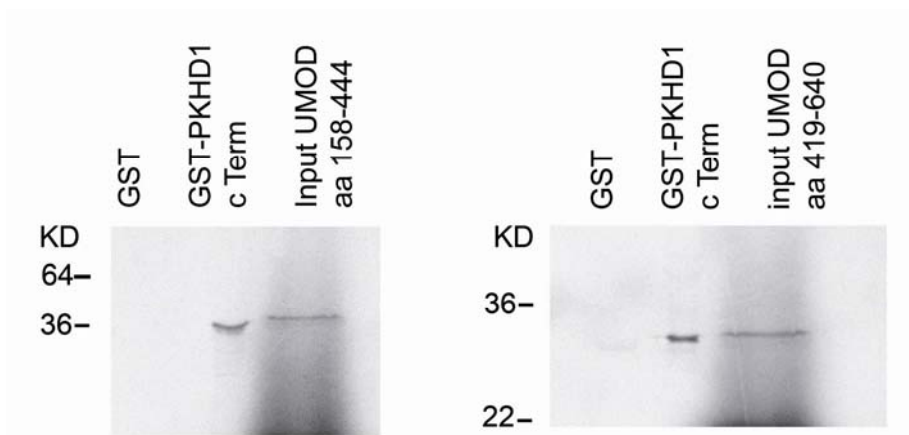


Abb. 3.17: Proteininteraktionsstudie von Uromodulin mit Polyduktin

Die Auftrennung der Proteine erfolgte elektrophoretisch in einem 12 %-igen PAA-Gel. Von GST-PKHD1-c-Term und GST wurde jeweils die gleiche Menge immobilisiert. Immobilisiertes GST-PKHD1-c-Term und GST wurden mit ^{35}S markierten Uromodulin-Mutanten, die die Aminosäuren 158 bis 444 (linke Abbildung) bzw. 419 bis 640 (rechte Abbildung) umfassen, inkubiert. Die Zahlen geben das Molekulargewicht in Kilodalton (KD) an. Auf die Gele wurden 10 % des ^{35}S -markierten Proteins (Input) zum Größenvergleich aufgetragen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

In Übereinstimmung mit den *in vivo* Daten der Hefe-Experimente binden die Aminosäuren 419 bis 444 von Uromodulin auch *in vitro* an den C-Terminus von Polyduktin. Diese Interaktion wird spezifisch durch den Uromodulin-Anteil im Fusionsprotein und nicht durch den GST-Anteil des Fusionsproteins hervorgerufen.

Weiterhin wurde das Experiment in umgekehrter Richtung durchgeführt, indem die Uromodulin-Mutanten an Sepharose gekoppelt und mit radioaktiv markiertem Polyduktin C-Terminus inkubiert wurden. Hierzu wurde die Uromodulin-cDNS der verschiedenen Mutanten mit den Enzymen *EcoRI* und *XhoI* aus dem jeweiligen pCRII-TOPO-Vektor ausgeschnitten und in pGEX-4T2 ligiert. Zudem wurde die cDNS, welche für die Aminosäure 3881 bis 4074 von Polyduktin kodiert mit den Enzymen *EcoRI* und *BamHI* aus pGBK-hcTerm isoliert und in den pCMX-Flag-Vektor ligiert.

Die Fusionsproteine wurden in *E. coli* BL21pLysS transformiert, exprimiert und anschließend isoliert. Es zeigte sich, dass die Induktion des kompletten Uromodulin-Proteins zu schwach war, um genügend Protein für die Proteininteraktionsstudie zu gewinnen. Auch durch Variation der Parameter gelang es nicht, die Proteinausbeute zu steigern.

Die Uromodulin-Fragmente AS 158-444, AS 298-557 und AS 419-640 ließen sich sehr gut induzieren, es zeigte sich jedoch, dass die Fusionsproteine unlöslich waren und somit nicht für eine Proteininteraktionsstudie geeignet. Die Variation der Parameter, sowie die Verwendung verschiedener *E. coli*-Stämmen konnten die Löslichkeit der Uromodulin-Mutanten nicht erhöhen.

Somit konnte die Proteininteraktionsstudie lediglich mit dem Fusionsprotein aus GST und den Aminosäuren 419 bis 444 von Uromodulin durchgeführt werden. Es wurden gleiche Proteinmengen an Uromodulin-Fusionsprotein und GST an Sepharose immobilisiert (Abb. 3.18 A) und mit ^{35}S -markierten Polyduktin inkubiert.

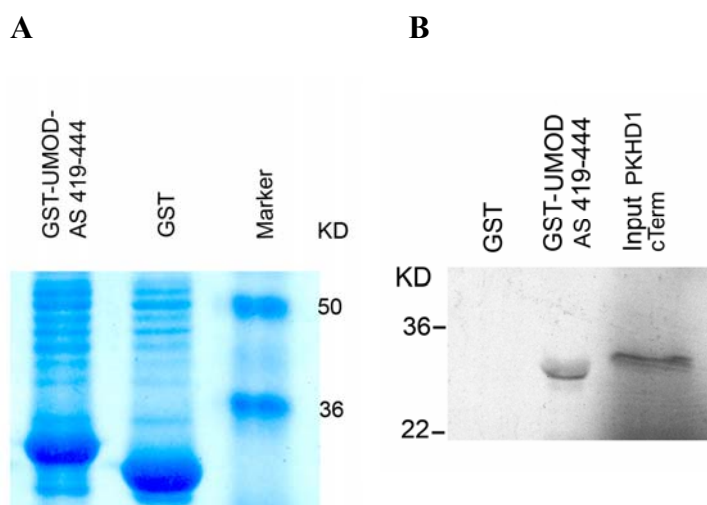


Abb. 3.18: Proteininteraktionsstudien mit Uromodulin und Polyduktin

Die Auftrennung der Proteine erfolgte elektrophoretisch in einem 10 %-igen PAA-Gel. A) Rohlysate mit den exprimierten Proteinen wurden an GST-Sepharose immobilisiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Dies zeigt, dass gleiche Mengen Proteine verwendet wurden. B) Immobilisiertes GST-UMOD AS 419-444- bzw. GST-Protein wurde mit dem ^{35}S -markierten C-Terminus von Polyduktin inkubiert. Polyduktin war in der Lage an das Fusionsprotein GST-UMOD AS 419-444 zu binden, bindet aber nicht an den GST-Anteil im Fusionsprotein.

Wie aus Abb. 3.18 (B) hervorgeht, bindet der C-Terminus von Polyduktin *in vitro* an die Aminosäuren 419 bis 444 von Uromodulin. Dies bestätigt die Ergebnisse der Hefeexperimente.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Aminosäuren 419 bis 444 für die Bindung von Uromodulin an den C-Terminus von Polyduktin ausreichend sind.

6.5 Immunohistochemischer Nachweis von Nierenmarkern in Normalgewebe und Gewebe aus ARPKD-Patienten

In der Literatur wird für Polyduktin in adultem Gewebe eine Expression in dem aufsteigenden Ast der Henle-Schleife, den distalen Tubuli und Sammelrohren beschrieben [Ward et al., 2003; Menezes et al., 2004]. In embryonalem Gewebe wurden starke Signale in den Ureterknospen und schwächere Signale in den sich entwickelnden Nephronen beobachtet [Ward et al., 2003]. Für Uromodulin wird ein Vorkommen im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife, sowie in den distalen Tubuli beschrieben [Sikri et al., 1979; Peach et al., 1988]. Um eine Kolokalisation in den Henle-Schleifen und den distalen Tubuli zu bestätigen wurden immunohistochemische Untersuchungen mit dem Nierenmarker EMA (Epithelial Membrane Antigen) und einem Antikörper gegen hochmolekulare Cytokeratine (34 β 12) in Normalgewebe durchgeführt. In Geweben von ARPKD-Patienten auf Serienschnitten wurde immunohistochemisch Untersuchungen für Uromodulin vorgenommen. Mit EMA können die Henle-Schleife, distale Tubuli und die Sammelrohre dargestellt werden. Die Sammelrohre werden durch 34 β 12 markiert.

In Abbildung 3.19 sind die immunohistochemischen Untersuchungen für gesundes Nierengewebe gezeigt. In Abbildung 3.20 werden die Ergebnisse der immunohistochemischen Untersuchung auf Nierengewebe von einem Patienten mit einer homozygoten Abbruchmutation in Exon 61 (R3482X) repräsentativ für die Daten der Untersuchungen an Patientengewebe dargestellt.

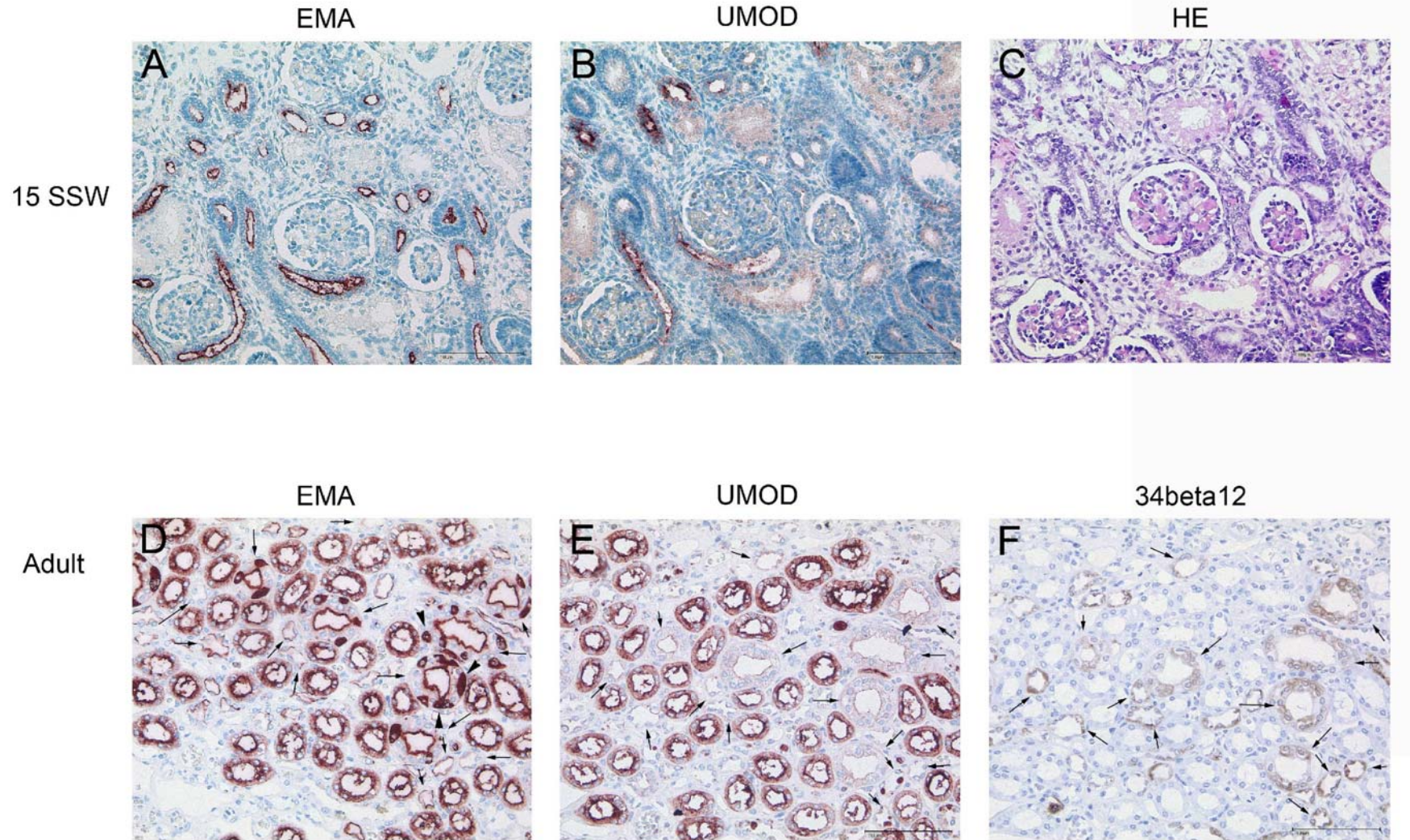


Abb. 3.19: Immunohistochemische Untersuchung an humanem Nierengewebe auf Serienschritten

Humanes Nierengewebe eines Embryos der 15. Schwangerschaftswoche (SSW) und adultes Nierengewebe wurden immunohistochemisch auf EMA (A, D) und Uromodulin (UMOD, B, E) untersucht. Immunohistochemischer Nachweis von 34β12 in adulten Gewebe (F). HE-Färbung von fetalem Nierengewebe (15. SSW, C) Sammelrohre exprimieren EMA an der luminalen Membran (A, D). In den interkalierende Zellen der Sammelrohre wird EMA diffuse cytoplasmatisch exprimiert (Pfeilspitze in D). Uromodulin (B, E) und EMA (A, D) kolokalisieren in den Henle-Schleifen und den distalen Tubuli. In den Sammelrohren (Pfeile in D, E und F) die durch EMA (D) und 34β12 (F) markiert werden, kann kein Uromodulin (E) nachgewiesen werden. Größenbalken entsprechen in allen Bilder 100 µm.

Ex61: R3482X
Homozygot

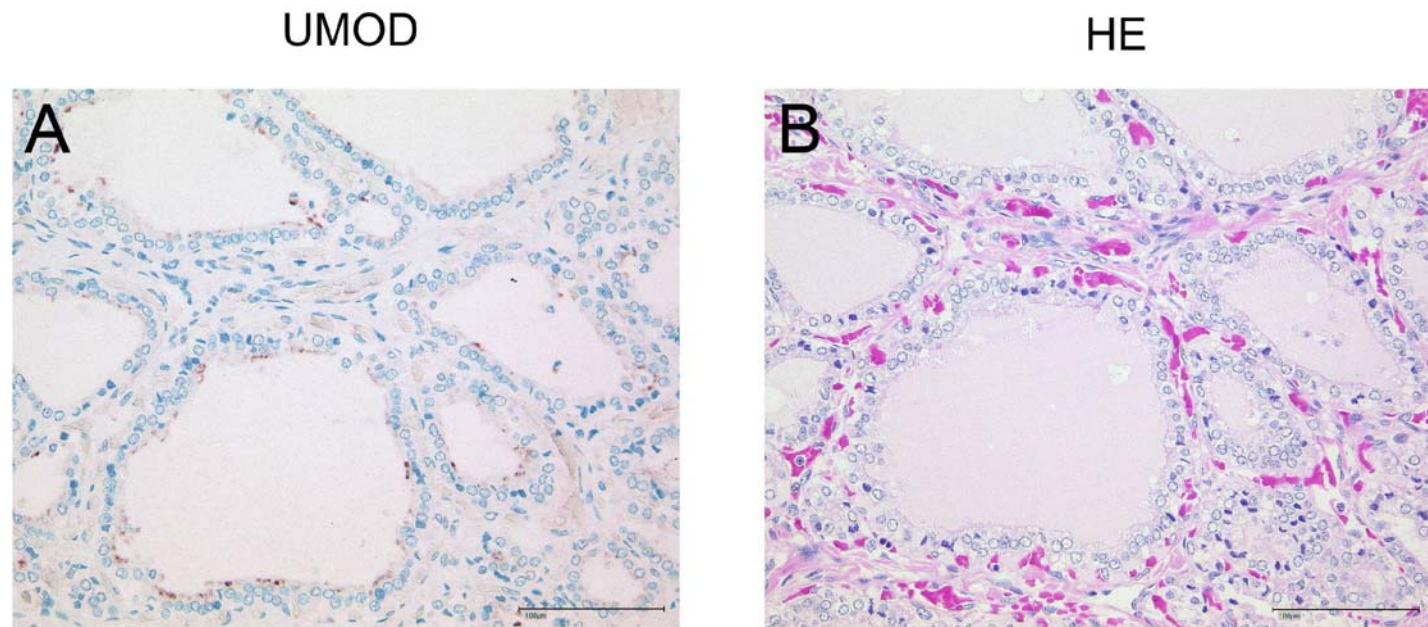


Abb. 3.20: Immunohistochemische Untersuchung auf humanem Nierengewebe in Serienschritten

A) Nierengewebe von einem ARPKD-Patienten mit einer homozygoten Mutation in Exon 61 R3482X wurde immunohistochemisch auf Uromodulin-Expression untersucht.
B) Histomorphologische Darstellung des selben Nierengewebes durch HE-Färbung. Größenbalken entsprechen 100 µm.

Die immunohistochemischen Untersuchungen für EMA an fötalem Nierengewebe der 15. Schwangerschaftswoche weist nach, dass EMA bereits in den tubulären Strukturen dieses Stadiums nachgewiesen werden kann (Abb. 3.19 A). An dem selben Nierengewebe konnte auch für Uromodulin eine Expression in diesen tubulären Strukturen nachgewiesen werden (Abb. 3.19 B). In manchen Strukturen konnte eine Expression von EMA, jedoch nicht von Uromodulin beobachtet werden. Es handelt sich hierbei um Strukturen, die sich später zu Sammelrohren entwickeln.

Eine Expression von EMA wurde in adultem Gewebe in den Henle-Schleifen, den distalen Tubuli und den Sammelrohren nachgewiesen (Abb. 3.19 D). EMA konnte in den Sammelrohren an der luminalen Membran nachgewiesen werden. In den interkalierenden Zellen der Sammelrohren wird EMA diffus im Cytoplasma exprimiert. Uromodulin wird auch in den Henle-Schleifen und den distalen Tubuli exprimiert, nicht jedoch in den Sammelrohren, wie Abbildung 3.19 E und F zu entnehmen ist, denn Zellen, die positiv für 34 β 12 sind, sind negativ für Uromodulin. EMA und Uromodulin kolokalisieren somit sowohl in fötalem (15 SSW), als auch im adulten Gewebe in den Henle-Schleifen und distalen Tubuli.

Die Untersuchungen an Nierengewebe von ARPKD-Patienten zeigt, dass Uromodulin in den Epithelien der Zysten nachgewiesen werden kann (Abb. 3.20 A). In einem Patienten, mit einer homozygoten Abbruchmutation in Exon 61 (R3482X), ist nur noch eine sehr geringe Menge an Uromodulin nachweisbar. Uromodulin befindet sich ausschließlich an der apikalen Zellmembran, sowohl in den zystisch erweiterten Strukturen, als auch in den nicht erweiterten Strukturen. Da Uromodulin jedoch nicht in den Sammelrohren vorkommt, handelt es sich in diesem Patienten wahrscheinlich um eine zystische Erweiterung der distalen Tubuli.

Diese Daten zeigen, dass Uromodulin und Polyduktin in den distalen Tubuli gemeinsam exprimiert werden.

6.6 Immunohistochemischer Nachweis von Polyduktin und Uromodulin in Normalgewebe und von Uromodulin in Gewebe aus ARPKD-Patienten

In ARPKD ist die terminale Differenzierung der Niere während der Embryonalentwicklung gestört. Eine Interaktion von Uromodulin und Polyduktin könnte möglicherweise für die terminale Differenzierung von Bedeutung sein. Die Expression von Polyduktin wurde bislang nur für humanes fötales Gewebe der 26. Schwangerschaftswoche nachgewiesen [Ward et al., 2003]. In dieser Arbeit wurde die Expression in humanem Nierengewebe eines Embryos der

15. Schwangerschaftswoche untersucht, um zu überprüfen, ob eine Interaktion zwischen Uromodulin und Polyduktin bereits während dieses frühen Stadiums der Embryonalentwicklung möglich wäre.

Wenn *in vivo* eine Interaktion zwischen Uromodulin und Polyduktin stattfände, so wäre zu erwarten, dass diese Interaktion bei ARPKD-Patienten beeinträchtigt ist, bei denen ein trunkiertes Polyduktin-Protein vorliegt. Um dies zu untersuchen, wurde die Uromodulinexpression in gesunder Niere verschiedener Entwicklungsstadien (15., 25., 30. Schwangerschaftswoche) und adulter Niere, sowie in Nierengewebe von ARPKD-Patienten immunohistochemisch untersucht.

6.6.1 Immunohistochemischer Nachweis von Polyduktin und Uromodulin in Normalgewebe

Immunohistochemische Untersuchungen für Polyduktin an humanem Nierengewebe der 15. Schwangerschaftswoche zeigten erstmals, dass Polyduktin bereits in diesem Entwicklungsstadium exprimiert wird. Polyduktin konnte im Cytoplasma und der Zellmembran nachgewiesen werden (Abb. 3.21). Die Färbung nahm in Richtung der apikalen Plasmamembran zu (Abb. 3.21, Pfeilspitze).

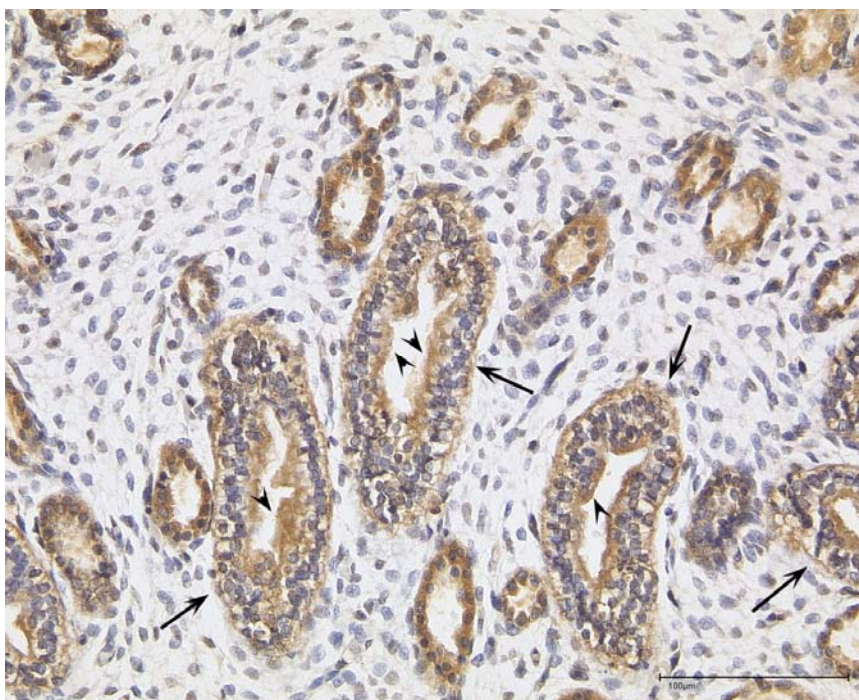


Abb. 3.21: Immunohistochemischer Nachweis von Polyduktin auf humanem Nierengewebe der 15. Schwangerschaftswoche
Bereits in der 15. Schwangerschaftswoche ist eine deutliche Polyduktinexpression zu beobachten. Das Signal ist cytoplasmatisch und teilweise membranär (Pfeile) sichtbar, wobei die Expression an der apikalen Zellmembran stärker ist (Pfeilspitze). Größenbalken entspricht 100 µm.

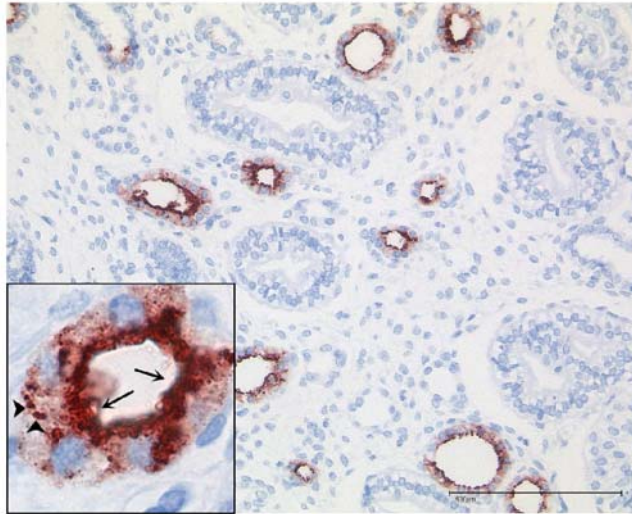
In dieser Arbeit konnte erstmals in der Niere eines gesunden humanen Embryos bereits in der 15. Schwangerschaftswoche eine starke Uromodulinexpression nachgewiesen werden. Das Protein befindet sich an der gesamten Zellmembran der tubulären Strukturen, verstärkt aber in der apikalen Membran (Abb. 3.22 Pfeil in A, B und D). In einigen der Zellen sind zudem vesikelartige Strukturen im Cytoplasma angefärbt (Abb. 3.22 Pfeilspitze in A, B und C). Bei diesen Strukturen handelt es sich um Vesikel, die Uromodulin vom endoplasmatischen Reticulum zum Golgi-Apparat und von dort zur Zellmembran transportieren.

Die immunohistochemischen Untersuchungen von gesundem Nierengewebe humaner Embryonen der 25. und der 30. Schwangerschaftswoche ergaben, dass die Expression von Uromodulin während der Entwicklung zunimmt. In der 25. SSW konnte eine stärkere Expression von Uromodulin beobachtet werden als in der 15. SSW. Von der 25. auf die 30. SSW steigerte sich diese Expression nur geringfügig. In beiden Fällen konnte Uromodulin, wie in der 15. SSW, an der gesamten Zellmembran nachgewiesen werden mit einem deutlich vermehrten Vorkommen an der apikalen Zellmembran. Die Transportvesikel konnten ebenfalls in allen Entwicklungsstadien nachgewiesen werden.

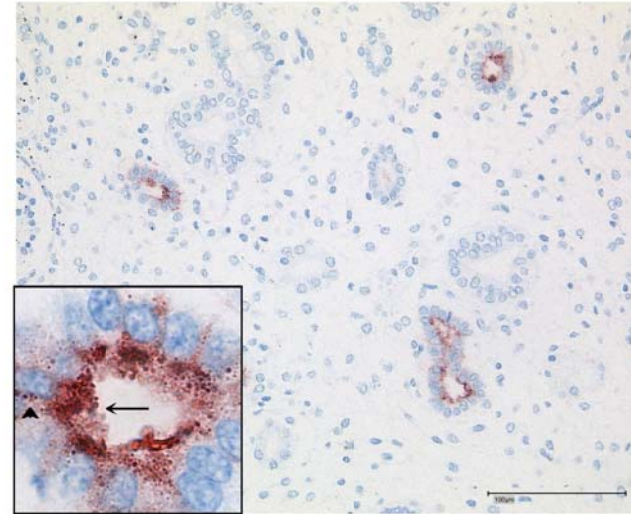
Vergleicht man die Uromodulinexpression in der adulten Niere mit den drei anderen Entwicklungsstadien, so ist diese entscheidend stärker. Diesen Untersuchungen zeigen nochmals, dass Uromodulin in den Henle-Schleifen und den distalen Tubuli exprimiert wird. Auch in der adulten Niere liegt ein stärkeres Signal für Uromodulin an der apikalen Membran, in Vergleich zu der übrigen Zellmembran, vor. Dennoch ist das Signal in der restlichen Membran um ein Vielfaches stärker als in den frühen Entwicklungsstadien. In adultem Nierengewebe können die Transportvesikel ebenfalls in einigen der Zellen beobachtet werden.

Diese Daten zeigen, dass Uromodulin bereits ab der 15. SSW stark exprimiert wird und diese Expression bis zum adulten Stadium steigt. Die Expression kann in der gesamten Zellmembran der Henle-Schleifen und der distalen Tubuli nachgewiesen werden, jedoch verstärkt in der apikalen Zellmembran. Während der Embryonalentwicklung und in adultem Gewebe können Transportvesikel für Uromodulin beobachtet werden. Polyduktin wird ebenfalls bereits ab der 15. SSW exprimiert und zeigt ein cytoplasmatisches Vorkommen, sowie eine Membranlokalisation.

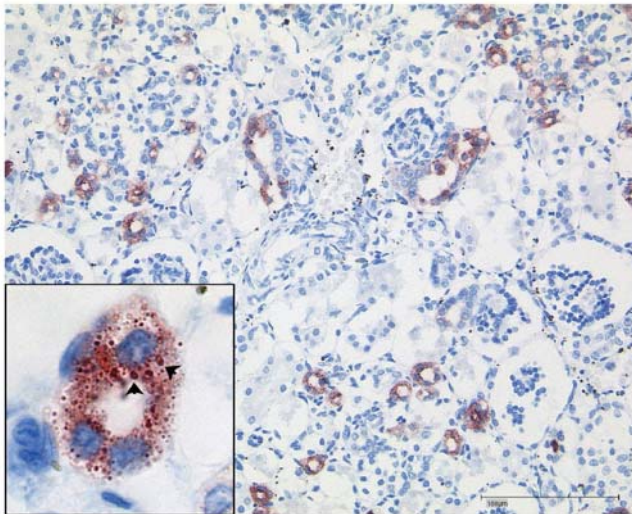
15 SSW



25 SSW



30 SSW



Adult

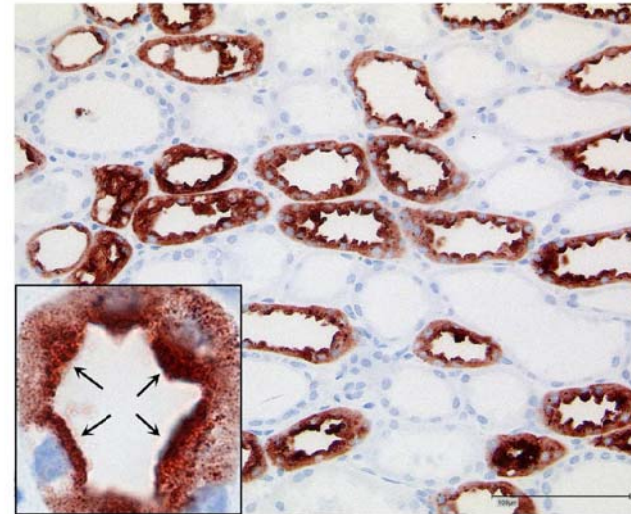


Abb. 3.22: Typischer Immunohistochemischer Nachweis von Uromodulin auf humanem Nierengewebe

Bereits in der 15. Schwangerschaftswoche (SSW) ist eine deutliche Uromodulin-Expression sichtbar. Das Signal ist an der gesamten Membran erkennbar, aber es ist apikal deutlich stärker (Pfeile in A, B und D). In manchen Zellen wurden vesikelartige Strukturen die positiv für Uromodulin sind beobachtet (Pfeilspitze in A, B und C). A) Nierengewebe 15. SSW, B) Nierengewebe 25. SSW, C) Nierengewebe 30. SSW, D) Adultes Nierengewebe. Einsätze in A, B, C und D zeigen eine Vergrößerung eines Querschnitts der Strukturen die positiv für Uromodulin sind. Größenbalken entsprechen 100 µm.

6.6.2 Immunohistochemischer Nachweis von Uromodulin bei ARPKD-Patienten

Die immunohistochemischen Ergebnisse des Nierengewebes von ARPKD-Patienten wurden mit dem Befund einer gesunden Niere gleicher Entwicklungsstufe verglichen. Da die Expression von Uromodulin abhängig vom Entwicklungsstadium des Embryos ist (vergleiche 6.6.1) kann nur dann eine Aussage bezüglich einer veränderten Uromodulinmenge in ARPKD-Patienten gemacht werden, wenn deren Niere mit einer gesunden Niere der gleichen Entwicklungsstufe verglichen wird.

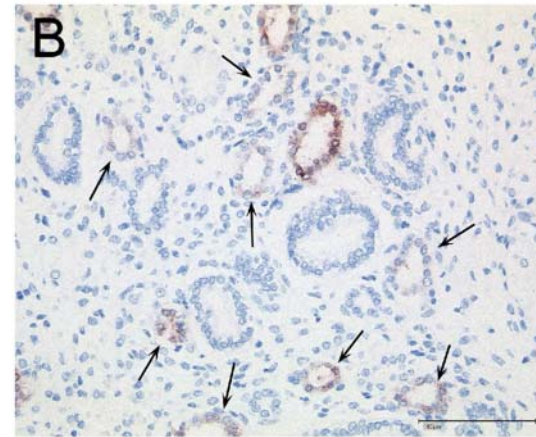
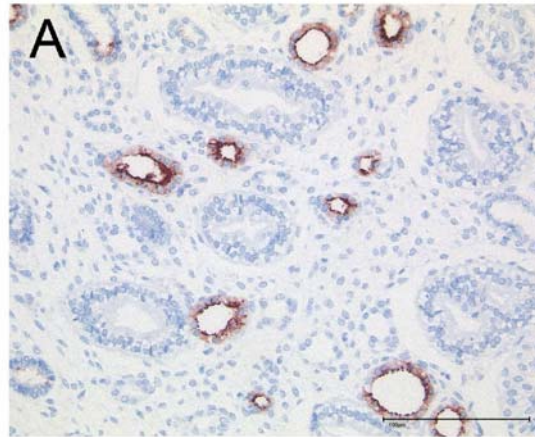
Bei fünf Patienten konnte nur ein sehr schwaches Signal für Uromodulin nachgewiesen werden, wie z. B. bei einem Patienten mit einer homozygoten Abbruchmutation in Exon 16 (R496X) (Abb. 3.25 B). Uromodulin kann schwach an der apikalen Membran nachgewiesen werden, jedoch nicht in der restlichen Zellmembran. Im Epithel einiger Zysten kann Uromodulin ebenfalls nachgewiesen werden.

Im Nierengewebe von weiteren sechs Patienten wurde mehr Uromodulin nachgewiesen als bei dem erwähnten Patienten, dennoch war die Menge an Uromodulin in diesem Patienten entscheidend weniger als bei den Kontrollnieren vergleichbarer Entwicklungsstufen. Als Beispiel ist hier ein Patient mit zwei Abbruchmutationen (Exon 20: W646X; Exon 61: Q3392X) erwähnt (Abb. 3.24 D). Uromodulin konnte in der apikalen Zellmembran nachgewiesen werden, aber in keiner der Strukturen der restlichen Zellmembran. Auch bei diesem Patienten konnte Uromodulin im Epithel von manchen Zysten nachgewiesen werden.

Die immunohistochemischen Untersuchungen haben in einem Fall ergeben, dass ein starkes Signal für Uromodulin vorhanden war, was dennoch schwächer als bei der Kontrollniere war. Es handelt sich hierbei um Nierengewebe eines Patienten mit einer homozygoten Mutation in Exon 61 (R3482X) (Abb. 3.25 C). Uromodulin konnte hier, im Gegensatz zu den oben erwähnten Patienten, in der ganze Zellmembran nachgewiesen werden. Wie bei der Kontrollniere war auch bei diesem Patienten ein stärkeres Uromodulinsignal an der apikalen Membran zu beobachten. Auffallend war jedoch, dass es auch einige Strukturen gab in denen die Uromodulinmenge deutlich schwächer war (Pfeil in Abb. 3.25 C). In keiner der untersuchten Kontrollnieren konnte dies beobachtet werden.

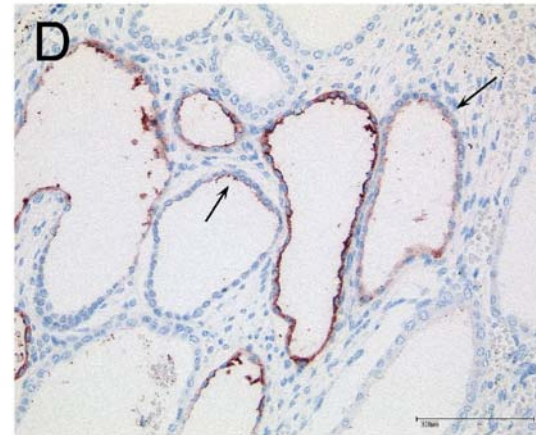
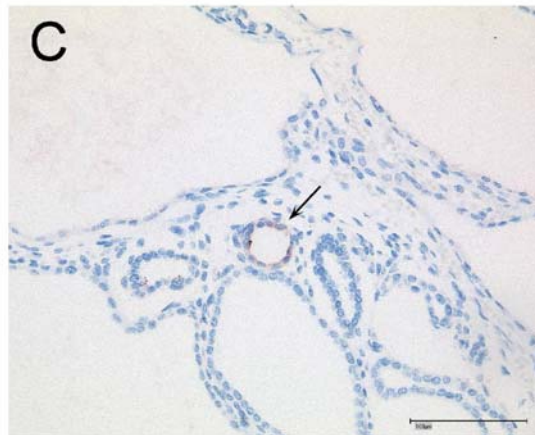
In einem Fall lag ein, mit der Kontrollniere, gleich starkes Signal für Uromodulin vor. Dieses Nierengewebe entstammte einem Patienten mit zwei Punktmutationen (Exon 3: T36M; Exon 27: M997K) (Abb. 3.24 D). Uromodulin kam in diesem Fall in der gesamten Zellmembran vor.

Kontrolle
15 SSW



Ex3: T36M
Ex61: L3494X3528
15 SSW

Ex32: A1254X
Ex37: G1971D
20 SSW



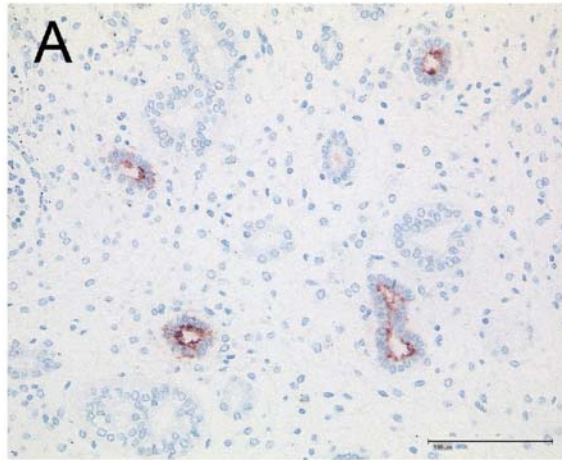
Ex32: R1419X
Homozygot
20 SSW

Abb. 3.23: Immunohistochemischer Nachweis von Uromodulin auf Nierengewebe von ARPKD-Patienten

Nierengewebe von ARPKD-Patienten mit den neben der Bilder angegebene Mutationen wurden immunohistochemisch auf Uromodulin-Expression untersucht und mit normalem Nierengewebe einer vergleichbaren Entwicklungsstufe (15. Schwangerschaftswoche (SSW)) verglichen. Bei dem Patienten mit einer trunkierenden Mutation und einem Aminosäureaustausch (B & C), sowie bei dem Patienten mit zwei Abbruchmutationen (D) ist ein deutlich schwächeres Signal für Uromodulin erkennbar als bei der Kontrollniere (A). Im Epithel einiger Zysten kann ein Signal für Uromodulin beobachtet werden (D). Die Pfeile in B, C und D zeigen auf Strukturen, die ein sehr schwaches Signal für Uromodulin aufweisen, das zudem nur auf die apikale Membran begrenzt ist. Größenbalken in A, B, C und D entsprechen 100 µm.

Kontrolle

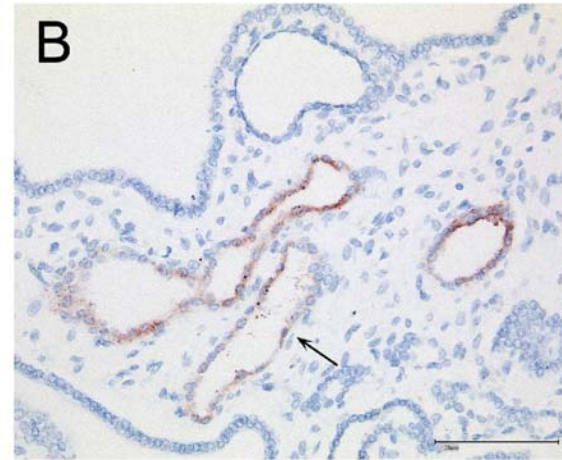
25 SSW



B

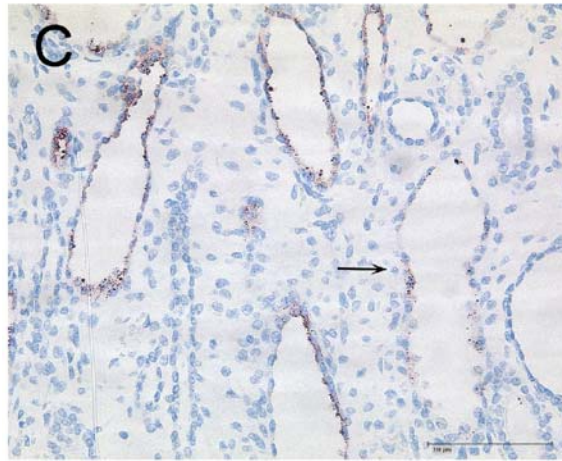
Ex21: D703N
Homozygot

25 SSW



Ex3: T36M
Ex58: R3107X

22 SSW



D

Ex20: W646X
Ex61: Q3392X

23 SSW

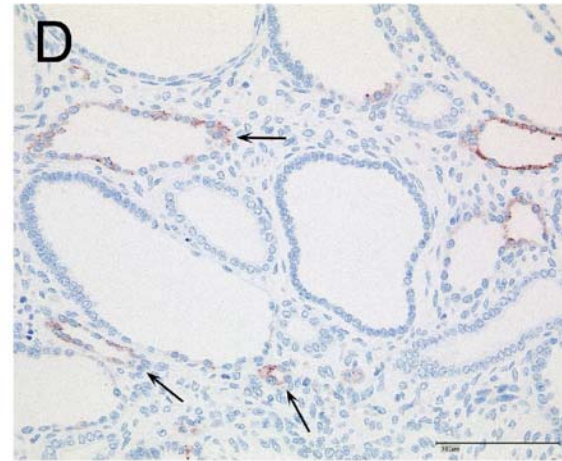
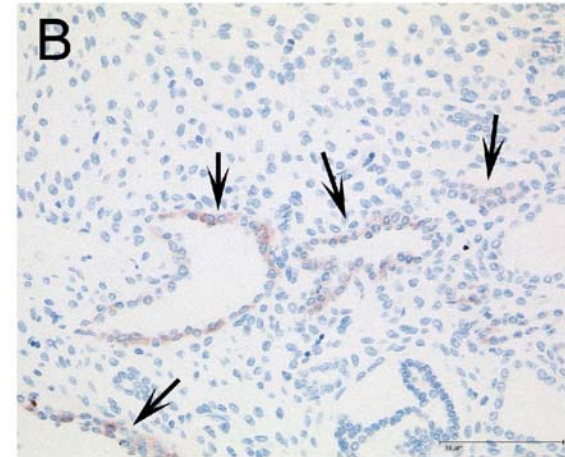
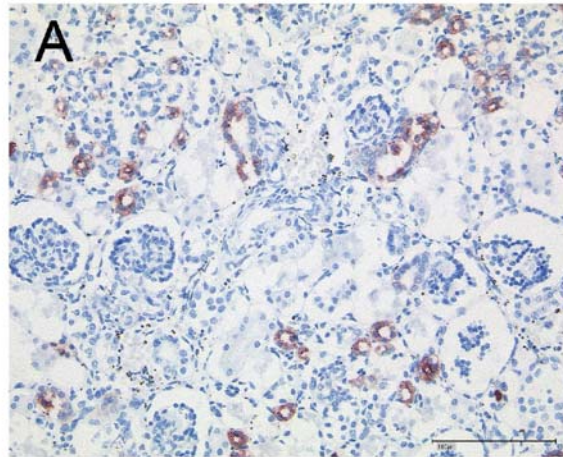


Abb. 3.24: Immunohistochemischer Nachweis von Uromodulin auf Nierengewebe von ARPKD-Patienten

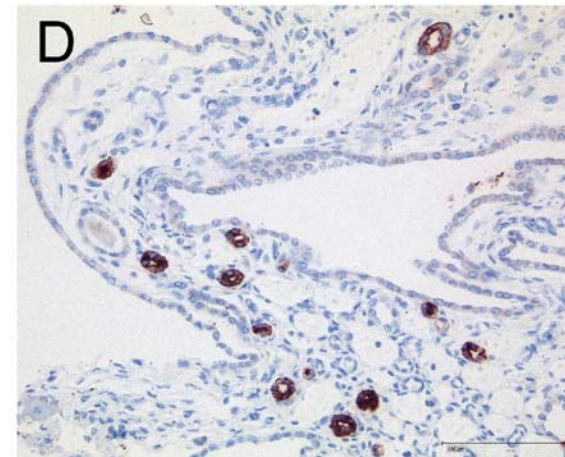
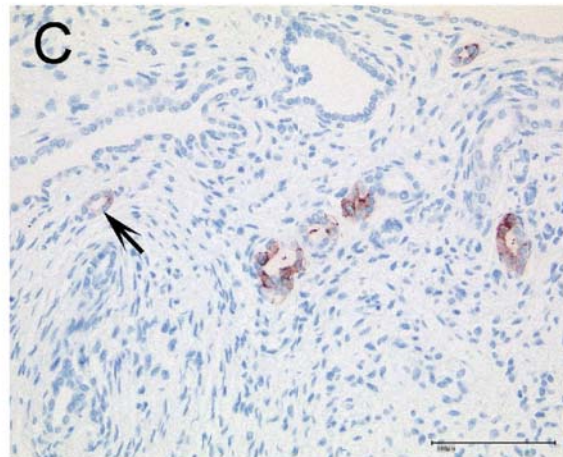
Nierengewebe von ARPKD-Patienten wurden immunohistochemisch auf Uromodulin-Expression untersucht und mit normalem Nierengewebe einer vergleichbaren Entwicklungsstufe verglichen. A) Kontrollniere eines Embryos der 25. Schwangerschaftswoche (SSW). B) Patient mit einer homozygoten Austauschmutation, die Aminosäure 703 betrifft. Der Pfeil zeigt auf eine Struktur, die an der apikalen Membran ein schwaches Signal für Uromodulin zeigt. C) Patient mit einer Aminosäureaustauschmutation und einer trunkierenden Mutation. Bei diesem Patienten ist ein schwächeres Uromodulinsignal erkennbar. Pfeil zeigt auf eine Struktur mit einem sehr schwachen Signal für Uromodulin. D) Nierengewebe eines Patienten mit zwei Abbruchmutationen zeigt ein sehr schwaches Uromodulin-Signal (Pfeile). Größenbalken in A, B, C und D entsprechen 100 µm.

Kontrolle
30 SSW



Ex16: R496X
Homozygot
30 SSW

Ex61: Q3392X
Homozygot
36 SSW



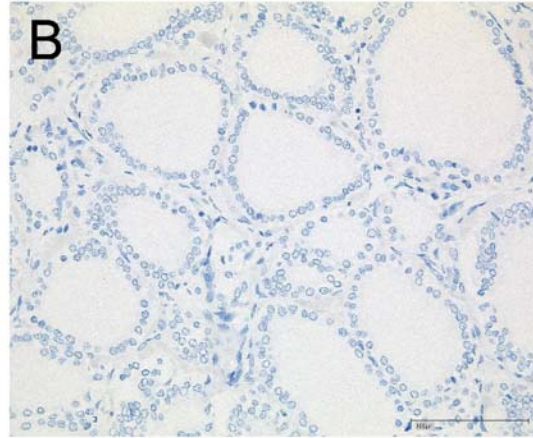
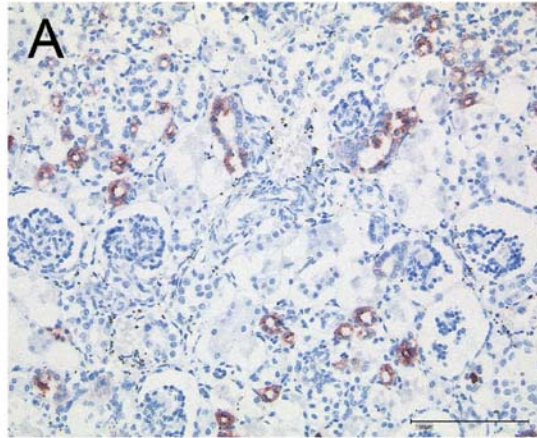
Ex3: T36M
Ex27: M997K
38 SSW

Abb. 3.25: Immunohistochemischer Nachweis von Uromodulin auf Nierengewebe von ARPKD-Patienten

Nierengewebe von ARPKD-Patienten wurden immunohistochemisch auf Uromodulin-Expression untersucht und mit normalem Nierengewebe vergleichbarer Entwicklungsstufe abgebildet. A) Kontrollniere eines Embryos der 30. Schwangerschaftswoche (SSW). B) Patient mit zwei trunkierenden Mutationen. Bei diesem Patienten ist ein schwächeres Signal für Uromodulin erkennbar. Pfeile zeigen auf Strukturen mit sehr schwachem, apikalem Signal. C) Patient mit einer homozygoten Abbruchmutation. Dieser Patient zeigt ein deutliches Signal für Uromodulin, das jedoch etwas schwächer ist als bei der Kontrollniere. Der Pfeil zeigt auf eine Struktur mit sehr schwachem Signal. D) Gewebe eines Patienten mit zwei Aminosäureaustauschmutationen. Das Uromodulinsignal ist vergleichbar stark wie beim Kontrollgewebe. Ein schwaches Signal kann ebenfalls im Epithel mancher Zysten beobachtet werden. Größenbalken in A, B, C und D entsprechen 100 µm.

Kontrolle

30SSW

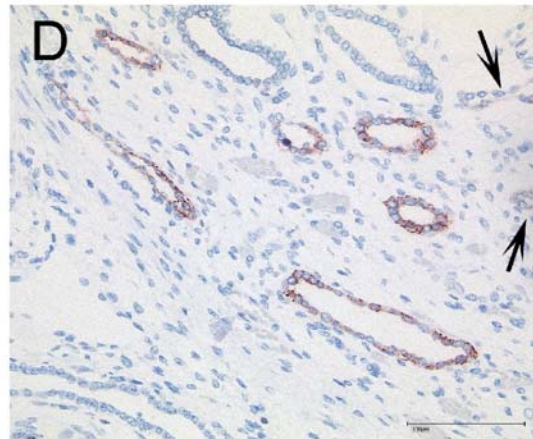
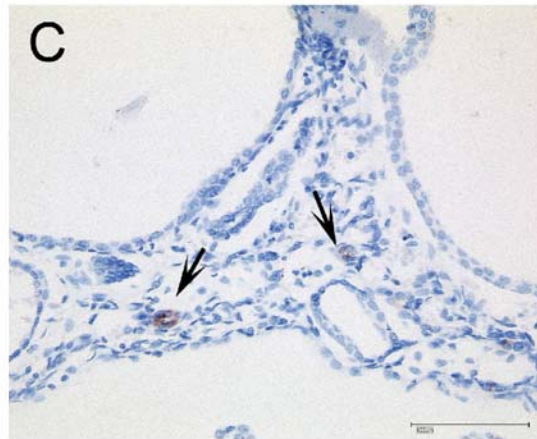


Ex61: R3482X
Homozygot

40 SSW

Ex3: T36M
Ex61: L3494X3528

6 p.p.



Ex32: G1320X1322
Homozygot

37 SSW

Abb. 3.26: Immunohistochemischer Nachweis von Uromodulin auf Nierengewebe von ARPKD-Patienten

Nierengewebe von mehreren ARPKD-Patienten wurden immunohistochemisch auf Uromodulin-Expression untersucht und mit einer gesunden Niere vergleichbarer Entwicklungsstufe (A, 30. Schwangerschaftswoche (SSW)) verglichen. B) Bei diesem Patienten mit homozygoter Abbruchmutation ist Uromodulin nicht mehr nachweisbar. C) In manchen Strukturen des Nierengewebes eines Patienten mit einer Abbruchmutation und einer Austauschmutation, ist ein sehr schwaches Signal für Uromodulin erkennbar, das mit den Pfeilen gekennzeichnet ist. D) Nierengewebe eines Patienten mit homozygoter Abbruchmutation. Deutliches aber schwächeres Uromodulinsignal in Vergleich zur Kontrolle. Die Pfeile zeigen auf Strukturen mit sehr schwachem Signal. Größenbalken in A, B, C und D entsprechen 100 µm.

Detaillierte Daten zu den immunohistochemischen Befunden finden sich in der nachstehenden Tabelle.

Tab. 3. 2: Tabellarische Übersicht der immunohistochemisch untersuchten ARPKD-Patientenproben

Nierengewebe von ARPKD-Patienten mit verschiedenen Mutationen wurden immunohistochemisch auf Uromodulin untersucht und mit gesundem Nierengewebe vergleichbarer Entwicklungsstufen verglichen (vergleiche auch Abb. 3.23 bis 3.26).

—: kaum Signal; (+/-): Uromodulin-Signal ist viel schwächer als bei einer gesunden Niere vergleichbarer Entwicklungsstufe; +: Signal ist stark, aber dennoch schwächer als bei der Kontrollniere, ++: Signal ist vergleichbar stark wie bei der Kontrollniere.

	Familie	SSW	Mutation		Uromodulin
			Allel 1	Allel 2	
Zwei Abbruchmutationen					
	304	20	Ex32: R1419X	Ex32: R1419X	(+/-)
	312	23	Ex20: W646X	Ex61: Q3392X	(+/-)
	360	40	Ex61: R3482X	Ex61: R3482X	-
	403	36	Ex61: Q3392X	Ex61: Q3392X	+
	413	37	Ex32: 320fsX1322	Ex32: 320fsX1322	(+/-)
	478	30	Ex16: R496X	Ex16: R496X	-
	551	40	Ex61: Q3407X	Ex61: Q3407X	-
Ein Abbruch/ ein AS-Austausch					
	427 # 1	6 p.p	Ex3: T36M	Ex61: 3494X3528	-
	427 # 2	15	Ex3: T36M	Ex61: 3494X3528	(+/-)
	452	22	Ex3: T36M	Ex58: R3107X	(+/-)
	479	20	Ex32: A1254X	Ex37: G1971D	-
Zwei AS-Austausche					
	111	38	Ex3: T36M	Ex27: M997K	++
	225	25	Ex21: D703N	Ex21: D703N	(+/-)

Zusammenfassend kann man sagen, dass die immunohistochemischen Daten nachweisen, dass Patienten mit einem trunkierten Polyduktin-Protein eine deutlich erniedrigte Uromodulin-Konzentration an der Zellmembran zeigen, sowie eine Erniedrigung der Gesamtmenge an Uromodulin in der ganzen Zelle. Uromodulin kommt in Nierengewebe von Patienten mit trunkiertem Polyduktin in fast allen untersuchten Gewebe nur an der apikalen Zellmembran und nicht in der restlichen Zellmembran vor, wie es bei gesundem Nierengewebe einer ähnlichen Entwicklungsstufe der Fall ist. Bei einigen Patienten kann Uromodulin in den Epithelien einiger Zysten nachgewiesen werden.

IV. Diskussion

Die Funktion des in ARPKD-Patienten mutierten Proteins Polyduktin ist bislang unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es, mittels eines Hefe-zwei-Hybrid-Experiments Interaktionspartner von Polyduktin zu identifizieren, um Hinweise auf dessen biologische Funktion zu erhalten. Bislang wurde nur ein interagierendes Protein, CAML, beschrieben [Nagano et al., 2005].

Aufgrund von Strukturanalysen kann angenommen werden, dass es sich bei dem Protein um ein Typ I-Membranprotein handelt. Der cytoplasmatische Carboxyterminus von Polyduktin enthält potentiellen Phosphorylierungsstellen und transloziert nach proteolytische Spaltung in den Nukleus [Ward et al., 2002; Hiesberger et al., 2006; Kaimori et al., 2007]. Aus diesem Grund wurde mit dem C-Terminus (Aminosäuren 3881 bis 4074) von Polyduktin als Köderprotein eine humane fötale Nieren-cDNS-Bibliothek nach potentiellen Interaktionspartnern durchsucht.

Der experimentelle Ansatz führte zur Isolierung von vier Klonen die mit Polyduktin interagieren. Alle isolierten Klone sind Partialklone und weisen Homologien zu bekannten Proteinen auf.

1. Potentielle Interaktion zwischen MLLT10 und Polyduktin

Die Funktion des Proteins MLLT10 (auch als AF10 bezeichnet) ist bislang unbekannt. Mehrere Spleißvarianten sind bekannt und der längste offene Leserahmen kodiert für ein Protein von 1027 Aminosäuren, das im N-terminalen Bereich eine PHD (Plant Homeodomain)-Domäne und im C-terminalen Bereich einen Leucin-Zipper besitzt. Die PHD-Domäne nimmt die Struktur eines Zink-Fingers an. Zn-Finger werden bei nucleären Proteinen gefunden. Es wird vermutet, dass sie Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. Die PHD-Domäne ist wichtig für die Entstehung oder Aktivität von Multikomponenten-Komplexen, welche in transkriptionelle Aktivierung oder Reprimierung involviert sind. Beim Leucin-Zipper handelt es sich dagegen um eine Domäne, welche Protein-Dimerisierungen vermittelt. Chromosomale Translokationen, die zur Fusion des carboxyterminalen Bereichs von MLLT10, der den Leucin-Zipper enthält, mit dem aminoterminalen Bereich von MLL oder CALM führen, sind mit Leukämie assoziiert [van Limbergen et al., 2002].

Obwohl für MLLT10 eine Funktion als Transkriptionsfaktor vermutet wird, konnten bislang noch keine MLLT10-abhängigen Gene identifiziert werden. Mittels Zellkulturversuchen

konnte jedoch nachgewiesen werden, dass MLLT10 transkriptionelle Aktivität besitzt [DiMartino et al., 2002].

Das Hefe-zwei-Hybrid-System ist ein artifizielles System, wodurch auch die Interaktion von Proteinen ermöglicht wird, die *in vivo* in verschiedenen Zelltypen oder Zell-Kompartimenten vorkommen. Die Kolokalisation zweier Proteine im selben Zelltyp und selben Zell-Kompartiment ist Voraussetzung für ihre physische Interaktion.

Linder et al. [1998] identifizierten das murine Homolog von MLLT10. Northern Blot-Analysen von murinem Gewebe ergaben, dass MLLT10 tatsächlich auch in der Niere exprimiert wird. Zudem zeigten sie durch Western Blot-Experimente mit Proteinextrakten aus murinem Gewebe, dass MLLT10 sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus lokalisiert ist. Eine Interaktion wäre somit sowohl mit membrangebundenem Polyduktin, dessen C-Terminus ins Cytoplasma ragt, als auch mit dem nukleären C-Terminus nach dessen proteolytischer Abspaltung und Translokation in den Kern, möglich.

Wie für Polyduktin konnte auch für verschiedene andere Zilienproteine, die in polyzystischen Nierenerkrankungen mutiert sind, eine Translokation zum Nukleus und eine Interaktion mit Transkriptionsfaktoren gezeigt werden. So wird Polycystin-1 proteolytisch gespalten, und der C-Terminus transloziert in den Nukleus. Anschließend ist das Protein in der Lage, AP-1-abhängige Signaltransduktionswege zu aktivieren [Chauvet et al., 2004].

Im Nukleus konnten zudem zwei Isoformen von Inversin, dem Protein das in Nephronophthise Typ II mutiert ist und deren Funktionen bislang unbekannt sind, nachgewiesen werden [Nürnberger et al., 2002]. Von einem weiteren Nephronophthise-Protein, NPHP6 (CEP290) wurde nachgewiesen, dass es an den Transkriptionsfaktor ATF4 bindet und diesen aktiviert [Sayer et al., 2006].

Daraus lässt sich schließen, dass der C-Terminus von Polyduktin, nach proteolytischer Spaltung und Translokation in den Nukleus, gleich den oben genannten Zilienproteinen mit Transkriptionsfaktoren, beispielsweise MLLT10, interagiert und so deren transkriptionelle Aktivität beeinflusst.

2. OFD1 interagiert in Hefe nicht mit dem C-Terminus von Polyduktin

Mutierte Formen des OFD1-Proteins sind für die Erkrankung Oral-fazial-digital-Syndrom 1 verantwortlich. [Ferrante et al., 2001]. Es handelt sich hierbei um eine Erkrankung, die X-chromosomal dominant vererbt wird. Charakteristisch für die Erkrankung sind

Gesichtsmissbildungen im Mund- und Zahnbereich, Missbildungen der Hände und Füße, sowie Missbildungen des zentralen Nervensystems und polyzystische Nieren [Thauvin-Robinet et al., 2006].

Von OFD1 sind zwei Spleißvarianten bekannt, die eine kodiert für ein Protein von 1012 Aminosäuren, während die andere für ein Protein von 872 Aminosäuren kodiert. Beide Proteine enthalten mehrere Coiled-coil-Domänen. Mittels Northern Blot wurde gezeigt, dass OFD1 in verschiedenen Geweben exprimiert wird. Starke Expression wurde in Gehirn, Niere, Lunge und Plazenta beobachtet, schwächere darüberhinaus in Pankreas, Skelettmuskel, Leber und Herz [Conciliis et al., 1998].

Da sich das Syndrom mit polyzystischen Nieren präsentiert, war das OFD1-Protein von Interesse. Zudem war bereits bekannt, dass OFD1, gleich anderen Proteinen, die in polyzystischen Nierenerkrankungen mutiert sind, an primären Zilien lokalisiert ist [Romio et al., 2004; Giorgio et al., 2007]. Außerdem konnte das Protein im Nukleus nachgewiesen werden [Giorgio et al., 2007]. Somit wäre eine Interaktion des abgespaltenen C-Terminus von Polyduktin mit OFD1 im Nukleus denkbar und wird immer wieder diskutiert [Bergmann, persönliche Mitteilung]. Aufgrund dieser Überlegungen wurden nähere Untersuchungen mit OFD1 durchgeführt, obwohl nach dem initialen Screen keine β -Galactosidase-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Da jedoch eine Leserahmverschiebung in dem isolierten cDNS-Klon vorlag, wurde überprüft, ob diese für die fehlende Aktivität verantwortlich war. Dazu wurde ein OFD1-cDNS-Klon von RZPD bezogen und eine Vielzahl von Mutanten hergestellt und getestet.

Im durchgeführten β -Galactosidase-Test, der zur weiteren Verifizierung der potentiellen Interaktion beider Proteine durchgeführt wurde, konnte allerdings ebenfalls keine Aktivierung des Reportergens nachgewiesen werden. Hieraus lässt sich schließen, dass in diesem Versuchsansatz keine Interaktion zwischen dem C-Terminus von Polyduktin und OFD1 stattgefunden hat, oder dass die Interaktion zu schwach war, um mittels dieser Methode nachgewiesen zu werden.

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass in humanen Zellen eine Interaktion möglich ist. Möglicherweise werden bestimmte Kofaktoren benötigt, die in Hefezellen nicht vorliegen. So konnte zum Beispiel eine Interaktion zwischen Polyduktin und Polycystin-2 in Hefe-zwei-Hybrid-Experimenten nicht nachgewiesen werden, während Koimmunopräzipitations-Versuche in MDCK-Zellen eine schwache Interaktion aufwiesen [Wang et al., 2007]. In anderen Experimenten erforderte die Interaktion in Anwesenheit des Proteins Kif3b.

Kif3b ist eine Motor-Untereinheit von Kinesin-2, einem Protein, welches für den Transport in Zilien verantwortlich ist [Wu et al., 2006].

Von einigen Proteinen, welche in polyzystischen Nierenerkrankungen mutiert sind, wie Polycystin-1 und -2, sowie Nephrocystin-1, Inversin und Nephrocystin-2 bis -6, ist bekannt, dass sie im primären Zilium kolokalisieren, und man vermutet, dass sie in einem großen Proteinkomplex vorliegen. Noch ist jedoch nicht bekannt, inwieweit die verschiedenen Proteine miteinander interagieren. Es ist durchaus denkbar, dass OFD1 und Polyduktin im gleichen Proteinkomplex vorliegen und im selben Signalweg involviert sind, ohne dass eine direkte Interaktion zwischen beiden Proteinen stattfindet.

3. Interaktion von NPR1 mit Polyduktin

Der Natriuretische Peptid Rezeptor 1 (NPR1) gehört zusammen mit NPR2 und NPR3 zu den Natriuretischen Peptidrezeptoren. NPR1 ist ein Membranprotein, welches eine singuläre Transmembran-Domäne besitzt und dessen C-Terminus cytoplasmatisch lokalisiert ist. Das Proteinfsegment von Aminosäuren 705 bis 1061 von NPR1, welches für die verschiedenen Experimente verwendet wurde, ist Teil der cytoplasmatischen Domäne. Da die C-Termini beider Proteine im Cytoplasma lokalisiert sind, ist die Möglichkeit einer Interaktion gegeben. Zudem wird NPR1 in Nierengewebe stark exprimiert und erfüllt Funktionen in den distalen Tubuli und den Sammelrohren.

Drei verschiedene Liganden sind bekannt, die mit unterschiedlichen Affinitäten an die verschiedenen Rezeptoren binden. Die Liganden ANP (atrial natriuretic peptide; Atriales Natriuretisches Hormon) und BNP (brain natriuretic peptide; Gehirn-Natriuretisches Hormon) werden vom Herzen freigesetzt, während CNP (C-type natriuretic peptide; C-Typ-Natriuretisches Hormon) von Endothel-Zellen sezerniert wird. Sowohl ANP als auch BNP sind Liganden für NPR1, während CNP an NPR2 bindet. Alle drei Hormone sind in der Lage, NPR3 zu binden und sind in der Regulation des Blutdrucks und der kardiovaskulären Homöostase involviert. ANP übernimmt zudem eine Rolle in der Regulation der Nierenfunktion [Shi et al., 2003].

Die in Hefe gewonnenen Daten dieser Arbeit zeigen, dass der C-Terminus von Polyduktin mit NPR1 interagiert. Die Interaktion ist vergleichsweise schwach, konnte aber sowohl mittels ONPG-Test und β -Galactosidase-Filter-Test als auch mittels eines α -Galactosidaseexpressions-Tests nachgewiesen werden. Besonders die beiden letztgenannten

Tests zeigen, dass die Expression der Reportergene bei einer Kotransformation von Polyduktin mit den Aminosäuren 985 bis 1010 bzw. 985 bis 1061 von NPR1 erhöht wird. Hieraus lässt sich schließen, dass die Aminosäuren 985 bis 1010 von NPR1, welche dem aus der Bibliothek isolierten cDNS-Fragment entsprechen, ausreichend sind, um eine Interaktion mit dem C-Terminus von Polyduktin zu ermöglichen.

Da das NPR1-Gen sich in der acht cM umspannenden chromosomalen Region befindet, die das Krankheitsgen für MCKD Typ I enthält, wurde es als ursächliches Kandidaten-Gen zunächst in Betracht gezogen. Ein Zusammenhang zwischen MCKD und NPR1 wäre denkbar, da die Symptome Hypertonie, das erhöhte Ausscheiden von Salzen über den Urin, Polyurie und Verlust der Urinkonzentrierung [Koptides et al., 2001], von NPR1 hervorgerufen werden können.

Nach Bindung von ANP an seinen Rezeptor NPR1 inhibiert dieser die Salz- und Wasserreabsorption in den proximalen und distalen Tubuli, sowie in den Sammelrohren durch Hemmung der Freisetzung von Renin und Vasopressin [Shi et al., 2003]. Renin ist ein Enzym, welches eine Rolle in der Regulation des Blutdrucks spielt, während das Hormon Vasopressin die Reabsorption von Wasser in der Niere stimuliert. Zudem wird die Synthese und Freisetzung von Aldosteron inhibiert [Shi et al., 2003]. Dieses Hormon bewirkt die Reabsorption von Na^+ und die Exkretion von K^+ und H^+ im distalen Tubulus der Niere.

Eine Mutationsanalyse, die an fünf zyprischen Familien durchgeführt wurde, konnte jedoch keine krankheitsassoziierten Mutationen im NPR1-Gen identifizieren. Eine Rolle von NPR1 als regulierendes Gen ist hierdurch jedoch nicht ausgeschlossen [Koptides et al., 2001]. Zudem wurde die Hypothese aufgestellt, dass mehrere Gene in MCKD Typ I involviert sind, nachdem Mutationen in drei verschiedenen Genen (AK000210, CCT3 und SCAMP3) bei Patienten detektiert wurden [Wolf et al., 2006]. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei einer Mutationsanalyse einer größeren Anzahl von Patienten mit ethnisch unterschiedlichem Hintergrund krankheitsassoziierte Mutationen in NPR1 identifiziert werden könnten.

Eines der klinischen Symptome der ARPKD ist, wie bei MDCK, Hypertonie. So konnten Bergmann et al. [2005] in einer Untersuchung von 164 ARPKD-Patienten bei 75 % der Patienten eine Hypertonie feststellen. Diese Ergebnisse werden von Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen unterstützt, welche alle bei 60 bis 100 % der untersuchten Patienten Hypertonie feststellten [Kääriäinen et al., 1988; Kaplan et al., 1989; Gagnadoux et al., 1989]. Eine direkte Interaktion zwischen Polyduktin und NPR1 ist, ausgehend von den Hefe-Experimenten, wahrscheinlich. NPR1 könnte somit eine bedeutende Rolle bei

Nierenerkrankungen verschiedener Ätiologien spielen und für die Auslösung der Hypertonie sowohl bei MCKD- als auch bei ARPKD-Patienten verantwortlich sein.

Weiterhin wird für natriuretische Peptide eine Rolle in der Wachstumsregulation diskutiert. So wurde in Mäusen mit einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose gezeigt, dass Infusion mit CNP eine Inhibition der Zellproliferation von Lungenfibroblasten bewirkt [Murakami et al., 2004]. CNP vermittelt seine Signaltransduktion vorwiegend über NPR2 oder NPR3. Bei Ratten wurde mittels radioaktiv markierter Liganden gezeigt, dass sowohl während der Entwicklung als auch bei Nierenhypertrophie NPR3 in den Glomeruli stärker exprimiert wird als in den Nieren adulter, gesunder Tiere. Die Autoren spekulieren, dass die hohe Expression des NPR3-Rezeptors für die erhöhte Wachstumsrate der Niere verantwortlich sein könnte [Woodard et al., 2005].

Diese Daten implizieren, dass CNP eine Funktion als wachstumsregulierendes Peptid übernimmt und sowohl Wachstum inhibieren als auch stimulieren kann. Möglicherweise übernimmt ANP ähnliche Funktionen, die über den NPR1-Rezeptor vermittelt werden. Somit könnte NPR1 eine Rolle in der Wachstumsregulation derjenigen Nierenstrukturen spielen, die diesen Rezeptor exprimieren, wie distale Tubuli und Sammelrohre. Eine Veränderung der Signaltransduktion aufgrund von Polyduktinmutationen könnte sodann einen Effekt auf Wachstum und Entwicklung dieser Strukturen ausüben, was möglicherweise eine Rolle spielt bei der Zystenbildung in ARPKD. Dies wäre in Einklang mit der Beobachtung, dass bei Patienten mit trunkierenden Mutationen auf beiden Allelen ein schwererer Phänotyp auftritt als bei Patienten mit zwei Aminosäureaustauschmutationen. Im erstgenannten Fall würde die Signaltransduktion vollständig unterbrochen werden, was verheerende Auswirkungen auf Wachstum und Entwicklung der Niere hat.

Somit könnte die mögliche Interaktion zwischen Polyduktin und NPR1 eine Erklärung liefern für die Hypertonie, die bei vielen ARPKD-Patienten beobachtet wird, und könnte gleichzeitig von Bedeutung sein für Wachstum und Entwicklung bestimmter Nierenstrukturen. Zudem ist ein Zusammenhang zwischen NPR1 und anderen polyzystischen Nierenerkrankungen denkbar, da das Protein auch andere polyzystische Nierenerkrankungen beeinflussen könnte. Zurzeit belegen Daten aus Hefe diese interessante Interaktion zwischen Polyduktin und NPR1. Diese müsste näher charakterisiert werden, um eine Aussage über diese Interaktion und deren Rolle in Nierenentwicklung und Krankheit zu treffen.

4. Interaktion von C7 mit Polyduktin

Das Komplementsystem ist Teil der angeborenen Immunabwehr und besteht aus einer großen Zahl verschiedener Plasmaproteine. Die meisten sind inaktiv und werden erst bei einer Infektion aktiviert, um Pathogene zu opsonisieren und so inflammatorische Immunantworten auszulösen. Das Komplementsystem kann über einen antikörpervermittelten, klassischen Weg, über einen Mannose-bindenden Lektin aktivierten Lektinweg und über einen antikörper-unabhängigen, alternativen Weg aktiviert werden. Alle drei Wege führen zur Aktivierung der Komplement Komponente 3 (C3: component 3)-Konvertase, einer Serin-Protease, die eine Spaltungskaskade weiterer Komplementfaktoren auslöst und letztlich unter anderem zur Bildung des Membranangriffkomplexes (MAC: membrane attack complex) führt.

Das größere Fragment des gespaltenen C3, welches als C3b bezeichnet wird, wird an der Membran des Pathogens immobilisiert und ist in der Lage, die Bildung des MACs zu induzieren. Dieser Komplex wird aus den Komponenten C5b, C6, C7, C8 und C9 gebildet. Der Einbau von C7, einem Protein von 843 Aminosäuren, in den Komplex ermöglicht diesem, sich in die Zellmembran zu integrieren. Nachdem 10 bis 16 C9-Proteine polymerisiert und in dem Komplex eingebaut sind, entsteht eine Wasserpore in der Membran. Werden viele dieser Poren in der Membran eingebaut, kommt es zur Lyse der Zelle.

Eine starke Interaktion konnte zwischen dem C-Terminus von Polyduktin und den Aminosäuren 645 bis 843 von C7 mittels der Reportergene β -Galactosidase und α -Galactosidase nachgewiesen werden. Diese Interaktion konnte mittels Proteininteraktionsstudien verifiziert werden. Für die C7-Mutante, welche die Aminosäuren 335 bis 843 umfasst, wurde durch einen quantitativen β -Galactosidase-Test nachgewiesen, dass die Interaktion deutlich schwächer ist.

Nach Bindung von C7 an C5b-6 ist dieser Komplex in der Lage, in die Membran zu integrieren, wo die Komponenten C8 und C9 eingebaut werden. Es ist bekannt, dass der MAC nicht nur in pathogene Zellen, sondern auch in körpereigene Zellen eingebaut werden kann [Hänsch et al., 1981]. Hierdurch könnte C7 in räumliche Nähe zu Polyduktin gelangen, und eine Interaktion mit dem cytoplasmatischen C-Terminus von Polyduktin wäre möglich.

Mrug et al. [2008] analysierten *cpk*-Mäuse, welche ein Mausmodell für ARPKD darstellen, und verglichen die Genexpressionsprofile von Tieren die einen milden Phänotyp oder einen schweren Phänotyp aufweisen. Mittels eines Affymetrix 430 Arrays, welcher etwa 12.000 murine Gene enthält, konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von verschiedenen immunologisch relevanten Genen mit einem schweren Phänotyp assoziiert war. Die Gene, die am stärksten hochreguliert wurden, gehörten zur angeborenen Immunabwehr. Besonders

auffallend war die sehr hohe Expression von C3. Immunofluoreszenzuntersuchungen auf Nierengewebe von *cpk*- und Wildtyp-Mäusen zeigten eine erhöhte Expression im Epithel der Nierentubuli und Sammelrohre der *cpk*-Mäuse. Die erhöhte Expression dieses Proteins ließ sich mit Western Blot-Analysen auch im *bpk*-Mausmodell und bei ARPKD-Patienten nachweisen.

In einem Ratten-Modell für die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung, der Han:SPRD-Ratte, wurde ebenfalls eine erhöhte Expression von immunologisch relevanten Genen mittels Array-Analyse nachgewiesen. In diesem Modell waren neun verschiedene Komplement Komponenten-Gene, darunter auch C7, hochreguliert [Burtey et al., 2008].

Die nachgewiesene Hochregulation der immunologisch relevanten Gene könnte aufgrund einer sekundäre Aktivierung des angeborenen Immunsystems in der Folge der Erkrankung entstehen. Die Daten dieser Arbeit sind jedoch ein Hinweis darauf, dass die Komplement Komponenten ursächlich in die Krankheit involviert sein können.

Die Interaktion zwischen C7 und Polyduktin könnte eine Auswirkung auf die Signaltransduktion haben. So konnte gezeigt werden, dass der Einbau des MAC in körpereigene Zellen in nicht-lytischer Menge eine Translokalisierung von NF κ B vom Cytoplasma in den Nukleus zur Folge hat. Hierzu wurden HUVEC (human umbilical vein endothelial cells)-Zellen mit oder ohne MAC inkubiert und im Anschluss ein EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) durchgeführt um die Aktivität von NF κ B im Nukleus zu überprüfen. Die subzelluläre Lokalisation wurde mittels eines Western Blots für p65 nachgewiesen. Ohne MAC-Inkubation befand sich das p65 im Cytosol, und es konnte keine Bindung im EMSA nachgewiesen werden. Nach Inkubation mit dem MAC nahm die cytosolische Menge an p65 ab und die nucleäre zu. Zudem konnte im EMSA eine Bindung stattfinden. Wurden die gleichen Experimente mit den MAC-Komponenten ohne C7 durchgeführt, so zeigte sich, dass keine Translokalisierung von NF κ B stattfand. Dies lässt sich damit erklären, dass der Komplex nur dann in die Membran eingebaut werden kann, wenn C7 vorhanden ist [Kilgore et al., 1997].

Eine Interaktion mit dem cytoplasmatischen C-Terminus von Polyduktin könnte ebenfalls nach Einbau des Komplexes in der Membran stattfinden und Auswirkungen auf Signaltransduktionswege haben. Diese Auswirkungen können auf zwei verschiedenen Wegen stattfinden. Entweder führt einer Interaktion zwischen C7 und Polyduktin zu Aktivierung einer Signalkaskade, oder Polyduktin hindert den Ablauf einer Signalkaskade von C7, indem es dieses Protein gebunden hält. Im ersten Szenario würden in ARPKD-Patienten, welche aufgrund einer Abbruchmutation keinen Polyduktin C-Terminus mehr haben, bzw. dieser

nicht mehr in der Lage ist C7 zu binden, die Signalwege inhibiert werden. Hindert jedoch Polyduktin den Ablauf einer Signalkaskade, die von C7 initiiert wird, so würde diese bei ARPKD-Patienten aktiviert werden. Dies könnte zur Aktivierung von NF κ B und letztendlich zur Expression von NF κ B-abhängigen Genen führen.

Für das C7-Gesamtprotein konnte überraschender Weise keine Interaktion mit dem C-Terminus von Polyduktin nachgewiesen werden. Eine ähnliche Beobachtung wurde 2005 von Li et al. gemacht. In einem Hefe-zwei-Hybrid-Experiment mit den C-terminalen Aminosäuren 682 bis 968 von Polycystin-2 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Interaktion mit α -Actinin nicht mit dem gesamten C-Terminus, jedoch mit den Aminosäuren 821 bis 878 stattfand. In einer GST-Proteininteraktionsstudie konnte dennoch eine Bindung von α -Actinin an das Protein, welches die C-terminalen Aminosäuren 682 bis 968 umfasst, erzielt werden. Somit wird die Interaktion nicht durch die Konformation des Proteins unterbunden, sondern vermutlich übt eine Domäne innerhalb der Aminosäuren 682 bis 820 eine inhibierende Wirkung auf die Bindung aus [Li et al., 2005]. Möglicherweise befindet sich außerdem ein negativer Regulator bzw. eine Bindestelle für einen Regulator in der N-terminalen Region von C7, welche die Interaktion mit Polyduktin unterbindet. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass das Fusionsprotein aufgrund seiner Konformation eine Interaktion nicht zulässt, weil die Aminosäuren, an die der C-Terminus von Polyduktin bindet, maskiert sind.

Obwohl bereits in drei verschiedenen Tiermodellen für polyzystische Nierenerkrankungen, sowie bei ARPKD-Patienten eine erhöhte Expression von Genen der angeborenen Immunabwehr nachgewiesen werden konnte, ist bislang unbekannt, ob diese eine ursächliche Rolle in der Pathogenese spielen. Weitere Experimente sind notwendig, um die Interaktion zwischen C7 und Polyduktin genauer zu analysieren.

5. Interaktion von Uromodulin mit Polyduktin

Bei Uromodulin bzw. Tamm-Horsfall-Protein handelt es sich um das am häufigsten vorkommende Protein im Urin. Mutationen in UMOD können zu drei verschiedenen Nierenerkrankungen führen: der FJHN (familiar juvenile hyperuricemic nephropathy), MCKD2 und der dominanten glomerulozystischen Nierenerkrankung.

Uromodulin besteht aus 640 Aminosäuren, kann aber in seinem Molekulargewicht zwischen 85 und 95 kDa variieren, je nach Prozessierung des Proteins. Das Protein enthält vier EGF (Epidermal growth factors)-ähnliche Domänen, deren sich wiederholende Sequenz sechs

Cystein (Cys)-Reste beinhaltet, von denen angenommen wird, dass sie Disulfidbrücken bilden. Diese Disulfidbrücken sind wichtig für die dreidimensionale Struktur des Proteins und somit auch für seine Interaktion mit anderen Proteinen. Eine weitere Domäne des Proteins enthält acht konservierte Cys-Reste, deren Funktion noch nicht geklärt ist. Da eine Mutation in einem dieser Cys-Reste (Cys217) zu den oben genannten Uromodulin-assoziierten Nierenerkrankungen führen kann, ist anzunehmen, dass dieser Cys-Rest für die korrekte Konformation des Proteins wichtig ist [Yang et al., 2004]. Als letzte wichtige Domäne enthält das Protein eine Zona Pellucida-Domäne. Diese Domäne ist verantwortlich für die Polymerisierung des Proteins zu Filamenten [Jovine et al., 2002].

5.1 Die Aminosäuren 419 bis 444 von Uromodulin sind ausreichend für die Interaktion mit dem C-Terminus von Polyduktin

Damit die Interaktion zwischen Uromodulin und Polyduktin untersucht und die für die Bindung benötigte Region eingegrenzt werden konnte, wurden verschiedene Uromodulin-Mutanten hergestellt. Bei den Mutanten, die die Aminosäuren 158 bis 444, 298 bis 557 bzw. 419 bis 444 enthalten, war eine deutliche Expression der Reportergene β - und α -Galactosidase nachweisbar. Das Uromodulin-Fragment mit den Aminosäuren 419 bis 640 führte zu einer schwächeren Expression. Diese Experimente weisen eine Interaktion zwischen der Uromodulin-Mutante und dem C-Terminus von Polyduktin nach. Das Gesamtprotein zeigt im Hefesystem keine Interaktion.

Um die Interaktion zu verifizieren, wurden GST-Proteininteraktionsstudien durchgeführt. Diese bestätigten, dass die Aminosäuren 419 bis 444 von Uromodulin in der Lage waren, an den C-Terminus von Polyduktin zu binden. In Übereinstimmung mit den Daten aus dem Hefeexperimenten binden auch die Aminosäuren 158 bis 444 bzw. 419 bis 640 an dem C-Terminus von Polyduktin.

Die Tatsache, dass die Aminosäuren 419 bis 640 von Uromodulin in den GST-Proteininteraktionsstudien an Polyduktin binden, schließt aus, dass die Konformation des Proteinfragments eine Bindung verhindert. Die schwache Induktion der Reportergene durch dieses Fragment in den Hefenexperimenten könnte somit eher durch einen negativen Regulator erklärt werden, wie auch bereits für C7 diskutiert wurde. Ein möglicher negativer Regulator, der zwischen den Aminosäuren 444 und 640 bindet, würde auch Einfluss auf das

Gesamtprotein nehmen. Die fehlende Expression der Reportergene durch das Gesamtprotein wäre somit zu erklären.

Zudem ist denkbar, dass aufgrund einer veränderten Quartärstruktur des Proteins im Hefesystem keine Interaktion zwischen Uromodulin und Polyduktin stattfinden kann. Wie bereits erwähnt, polymerisiert Uromodulin zu Filamenten. Es ist bekannt, dass solche Proteine unter Umständen im Hefe-zwei-Hybrid-System keine Interaktion zeigen, da die Filamente nicht richtig gebildet werden, oder weil die filamentären Strukturen die Bildung eines funktionellen Transkriptionsfaktors nicht erlauben [Xu et al., 2001].

Sowohl die Expression der Reportergene, als auch die GST-Proteininteraktionsstudien zeigen, dass die Aminosäuren 419 bis 444 von Uromodulin ausreichend sind, um eine Bindung an den C-Terminus von Polyduktin zu vermitteln.

5.2 Partielle Kolokalisation von Polyduktin und Uromodulin

Für eine Interaktion spricht die Kolokalisation im gleichen Zelltyp. Für Uromodulin wurde eine Expression im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife sowie in den distalen Tubuli beschrieben [Peach et al., 1988; Sikri et al., 1979]. Die Expression von Uromodulin in den Sammelrohren ist nicht eindeutig geklärt. In früheren Arbeiten konnte eine Expression in den Sammelrohren nachgewiesen werden [Herman et al., 1963; Pollak und Arbel, 1969], während dies in neueren Studien nicht der Fall war [Peach et al., 1988; Georgas et al., 2008]. Diese Diskrepanzen könnten auf technische Unterschiede und unterschiedliche Antikörper zurückzuführen sein. Oftmals ist auch die zweifelsfreie Identifikation von einzelnen Nephronabschnitten schwierig.

In adultem Gewebe wird Polyduktin hauptsächlich in den distalen Tubuli und Sammelrohren exprimiert, während in embryonalem Gewebe ein starkes Signal in den Ureterknospen, sowie ein schwächeres Signal im sich entwickelnden Nephron detektiert werden konnte. Dagegen konnte in infantilem Nierengewebe in den Henle-Schleifen und den Sammelrohren ein Signal detektiert werden [Ward et al., 2003]. Eine Expression von Polyduktin im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife wurde mittels immunohistochemischer Methoden von Menezes et al. [2004] in humanem, adultem Nierengewebe beobachtet.

Eine Kolokalisation der beiden Proteine kommt somit laut Literatur während der Embryonalentwicklung in den distalen Tubuli des sich entwickelnden Nephrons vor, sowie in adultem Gewebe im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife und in den distalen Tubuli.

Zur Bestätigung der Koloalisation von Uromodulin und Polyduktin wurde sowohl normales Nierengewebe als auch Nierengewebe von ARPKD-Patienten auf die Expression des immunohistochemischen Markers EMA (Epithelial Membrane Antigen) und 34 β 12 untersucht. EMA kommt in den Henle-Schleifen, den distalen Tubuli und den Sammelrohren vor. Dagegen ist 34 β 12 ein Antikörper gegen hochmolekulare Cytokeratine und markiert ausschließlich den Sammelrohren. Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass Uromodulin in der Henle-Schleife und den distalen Tubuli, nicht jedoch in den Sammelrohren, exprimiert wird.

Die Zysten der ARPKD-Patienten sind Expansionen der distalen Tubuli und der Sammelrohre. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Zysten von ARPKD-Patienten mit Abbruchmutationen eine schwache Uromodulinexpression nachzuweisen ist (vergleiche Abb. 3.23 D und 3.24 B). In Übereinstimmung mit Verani et al. [1989] kann somit gezeigt werden, dass beide Proteine im selben Zelltyp vorkommen und eine Interaktion *in vivo* stattfinden kann.

Das Uromodulinsignal wurde in der gesamten Zellmembran der Henle-Schleifen und den distalen Tubuli beobachtet, mit einer stärkeren Expression an der apikalen Membran. Weiterhin wurden im Cytoplasma mancher Zellen, für Uromodulin positive, vesikelartige Strukturen beobachtet. Tatsächlich wurde bereits beschrieben, dass Uromodulin im Cytoplasma vorkommen kann [Peach et al., 1988; Rindler et al. 1990; Hodaňová et al., 2005]. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen auf Nierengewebe der Ratte wurden vesikelartige Strukturen, die für Uromodulin positiv waren, nachgewiesen. Diese Vesikel wurden zwischen dem Nukleus und der apikalen Membran beobachtet und sammelten sich an der apikalen Membran im Cytoplasma an. Ein Signal für Uromodulin wurde auch zwischen den Vesikeln beobachtet [Bachmann et al., 1985]. Die immunohistochemischen Ergebnisse für Uromodulin in dieser Arbeit schließen sich diesen Beobachtungen an. Diese subzelluläre Lokalisation von Uromodulin würde eine Interaktion mit Polyduktin erlauben (siehe 5.5).

5.3 Expression von Uromodulin und Polyduktin während der Embryonalentwicklung

In ARPKD sowie in anderen polyzystischen Nierenerkrankungen ist die terminale Differenzierung der Niere während der Embryonalentwicklung gestört. Möglicherweise ist die Interaktion zwischen Polyduktin und Uromodulin für die normale Entwicklung von

Bedeutung. Aus diesem Grund war es von Interesse, in welchen Entwicklungsstadien Polyduktin und Uromodulin exprimiert werden.

Um dies zu überprüfen, wurde die Expression von Uromodulin immunohistochemisch auf Nierengewebe von Embryonen der 15., 25., und 30. Schwangerschaftswoche, sowie auf adulter Niere untersucht. Die Expression von Polyduktin wurde auf humanem Nierengewebe der 15. Schwangerschaftswoche untersucht.

Eine Expression von Polyduktin wurde von Ward et al. [2003] in einem humanen Fötus der 26. Schwangerschaftswoche in der Ureterknospen, in den sich entwickelnden Nephronen und den Sammelrohren nachgewiesen. In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass bereits in der 15. Schwangerschaftswoche eine starke Polyduktinexpression vorhanden ist. In Einklang mit den Untersuchungen von Ward et al. [2003] wurde Polyduktin auch in diesem Entwicklungsstadium im Cytoplasma und an der Zellmembran nachgewiesen. Beide Arbeiten zeigen zudem eine verstärkte Expression an der apikalen Membran.

Erstmals konnte eine deutliche Expression von Uromodulin bereits in der 15. Schwangerschaftswoche nachgewiesen werden. Zimmerhackl et al. [1996] zeigten mittels immunohistochemischer Untersuchungen Uromodulinexpression in embryonalem Nierengewebe ab der 16. Schwangerschaftswoche. Uromodulin konnte jedoch in der amniotischen Flüssigkeit ab der 15. Schwangerschaftswoche nachgewiesen werden.

Obwohl das Protein in allen Stadien in der gesamten Zellmembran nachgewiesen werden konnte, war das Uromodulinsignal in der apikalen Membran deutlich stärker. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen anderer Gruppen [Sikri et al., 1979; Bachmann et al., 1985; Peach et al., 1988; Zimmerhackl et al., 1996]. Zudem wurden in allen vier untersuchten Stadien für Uromodulin positive vesikelartige Strukturen beobachtet (vergleiche Abb. 3.21 A, B, C, Pfeilspitzen).

Somit könnte die Interaktion zwischen Polyduktin und Uromodulin eine Rolle in der terminalen Differenzierung spielen, welche im Falle von trunkierenden Mutationen in Polyduktin bzw. Mutationen in Uromodulin gestört wäre.

In Patientengewebe von Embryonen der 15. Schwangerschaftswoche kann bereits beobachtet werden, dass ein trunkiertes Polyduktin mit einer erniedrigten Uromodulinkonzentration einhergeht (vergleiche Abb. 3.22 B). Diese Befunde weisen auf eine Interaktion der Proteine während der Entwicklung hin. Ob eine Interaktion beider Proteine tatsächlich in die Differenzierung involviert ist, muß gezeigt werden.

5.4 ARPKD-Patienten mit Abbruchmutationen zeigen einen signifikant erniedrigten Uromodulinpegel an der Membran

Weist das überlappende spatio-temporale Expressionsmuster von Polyduktin und Uromodulin bereits auf ihre mögliche Interaktion hin, so wird diese Annahme durch Daten von Nieren der ARPKD-Patienten unterstützt.

Bei Patienten mit einer Abbruchmutation kommt es zu einer Trunkierung des Proteins vor dem C-Terminus. Eine Interaktion mit Uromodulin sollte somit nicht mehr möglich sein. So war in fünf der elf untersuchten Nierengewebe von Patienten mit einer oder zwei Abbruchmutationen ein schwaches Signal für Uromodulin im Vergleich zur gesunden Niere, vorhanden. Bei weiteren fünf Patienten war eine signifikante Erniedrigung des Signals zu erkennen, obwohl es stärker war als bei den oben genannten Patienten. In allen diesen Fällen war das Signal in den Henle-Schleifen und distalen Tubuli hauptsächlich an der apikalen Zellmembran lokalisiert, in seltenen Fällen konnte Uromodulin in der gesamten Zellmembran nachgewiesen werden.

Nur bei Gewebe eines Patienten, der homozygot für die Mutation Ex61: Q3392X ist, wurde ein starkes Signal für Uromodulin in der gesamten Membran, beobachtet. Auch dieses Signal war schwächer als bei der altersentsprechenden Kontrollniere.

Die fehlende Interaktion zwischen Polyduktin und Uromodulin scheint somit Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von Uromodulin, sowie auf die Gesamtmenge an Uromodulin zu haben.

Das Ergebnis des Patienten mit der homozygoten Ex61: Q3392X-Mutation lässt sich möglicherweise damit erklären, dass von Polyduktin verschiedene Spleißvarianten bekannt sind [Onuchic et al., 2002]. Möglicherweise wird Exon 61 in einigen dieser Spleißvarianten übersprungen, so dass trotz dieser Mutation ein Protein mit intaktem C-Terminus gebildet würde, welches mit Uromodulin interagieren könnte.

5.5 Mögliche physische Interaktion zwischen Uromodulin und Polyduktin

In den letzten Jahren wurden immer mehr Beweise für einen Zusammenhang zwischen verschiedenen polyzystischen Nierenerkrankungen erbracht. Viele der verantwortlichen Proteine koloalisieren an den Zilien von Nierenepithelzellen, wie Polycystin-1 und -2, Nephrocystin-1, -4, -5 und -7 bis -10, Inversin und Polyduktin. Für einige der Proteine konnte bereits eine Interaktion mit einem oder mehreren der anderen, in polyzystischen

Nierenerkrankungen involvierte Proteine nachgewiesen werden. So ist z. B. eine Interaktion zwischen Polycystin-1 und -2 bekannt [Hanaoka et al., 2000]. Inversin und Nephrocystin-3 interagieren mit Nephrocystin-1 [Otto et al., 2003; Olbrich et al., 2003], und Nephrocystin-4 und -8 interagieren ebenfalls miteinander [Arts et al., 2007]. Obwohl die genauen Mechanismen noch unbekannt sind, implizieren diese Daten einen oder mehrere Signalwege, in den die verschiedenen Proteine gemeinsam involviert sind. Die Interaktion zwischen Polyduktin und Uromodulin ist ein weiterer Hinweis hierauf.

Für einen Zusammenhang zwischen den verschiedenen polyzystischen Nierenerkrankungen spricht weiterhin, dass mehrere der ursächlichen Gene von Transkriptionsfaktor, HNF-1 β , reguliert werden. Patienten, die eine Mutation in HNF-1 β tragen, entwickeln Diabetes (MODY5: maturity-onset diabetes of the young type 5) und zystische Missbildungen der Niere. Aufgrund der HNF-1 β -Expression in den sich entwickelnden proximalen und distalen Tubuli, sowie in den S-förmigen Kanälchen wurde eine Rolle in der Tubulusdifferenzierung postuliert [Hiesberger et al., 2004]. Mittels einer konditionalen „knock-out“-Maus konnte die Expression von HNF-1 β spezifisch in den Henle-Schleifen und Sammelrohren inhibiert werden. Mittels quantitativer RT-PCR und immunohistochemischer Untersuchungen wurde gezeigt, dass diese Mäuse eine deutlich erniedrigte Expression von *Pkhd1*, *Umod*, *Nphp1* und *Pkd2* aufweisen [Gresh et al., 2004]. Interessanterweise sind Mutationen in den für HNF-1 β und Uromodulin kodierenden Genen für die glomerulozystische Nierenerkrankung verantwortlich.

Ein weiteres Argument für eine physische Interaktion zwischen Uromodulin und Polyduktin *in vivo* ist die signifikant erniedrigte Menge an Uromodulin bei ARPKD-Patienten mit trankiertem Polyduktin. Dies lässt sich durch einen gemeinsamen Prozessierungsweg beider Proteine erklären.

GPI-Proteine werden, wie alle Membran- und sekretorischen Proteine, bei ihrer Synthese aufgrund eines aminoterminalen Signalpeptids zum endoplasmatischen Reticulum (ER) transloziert. Sowohl Polyduktin, als Membranprotein, als auch Uromodulin werden im ER gefaltet. Die verschiedenen Disulfidbrücken von Uromodulin werden hier gebildet, um dem Protein seine korrekte Faltung zu verleihen.

Mittels Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass die korrekte Faltung von Uromodulin essentiell ist für seine weitere Prozessierung und den Transport zur Membran. Zwölf verschiedene Uromodulin-Mutanten, die bekannten Patientenmutationen entsprechen, wurden transient in HEK293-Zellen exprimiert, die kein endogenes Uromodulin exprimieren. Fünf der Mutationen befanden sich in den EFG-ähnlichen Domänen, eine im zentralen Bereich des

Proteins, fünf in der Domäne mit den acht konservierten Cys-Resten und eine in der Zona Pellucida-Domäne. Alle Mutationen hatten einen Defekt in der Prozessierung des Proteins zur Folge. Die mutierten Proteine verblieben entweder im ER, oder ihre weitere Prozessierung zum Golgi-Apparat und letztendlich zur Membran erfolgte sehr viel langsamer als bei den Wildtyp-Proteinen [Bernascone et al., 2006].

Von Uromodulin ist bekannt, dass es an sieben von acht potentiellen Glykosylierungsstellen glykosyliert wird [van Rooijen et al., 1999]. Polyduktin weist im extrazellulären Bereich ebenfalls potentielle Glykosylierungsstellen auf [Ward et al., 2002]. Das Anfangsstadium der Glykosylierung von Proteinen findet im ER statt, und nach Transport der Proteine zum Golgi-Apparat können diese weiter modifiziert werden, bzw. weitere Glykosylierungen stattfinden, wie dies auch bei Uromodulin der Fall ist.

Proteine, die vom ER zum Golgi-Apparat transportiert werden, werden in Vesikeln von der ER-Membran abgeschnürt die mit der Golgi-Membran fusionieren. Nachdem die Proteine im Golgi-Apparat modifiziert wurden, werden sie in Vesikel sortiert, die sie zu ihrer Endposition bringen.

In den im Rahmen dieser Arbeit für Uromodulin durchgeführten immunohistochemischen Analyse wurden solche Vesikel im Cytoplasma beobachtet. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Nierengewebe der Ratte zeigten Vesikel, die Uromodulin beinhalten, im Cytoplasma zwischen Nukleus und apikaler Zellmembran, sowie solche, die sich an der apikalen Membran gesammelt hatten [Bachmann et al., 1985].

Polyduktin und Uromodulin werden somit über den gleichen sekretorischen Weg prozessiert und transportiert. Während dieser Prozessierung besteht die Möglichkeit, dass beide Proteine in Kontakt kommen und miteinander interagieren. Möglicherweise spielt diese Interaktion eine Rolle beim Transport von Uromodulin zur apikalen Membran.

Die biologischen Funktionen des GPI-Ankers, neben der Bindung des Proteins an die Membran, sind noch nicht geklärt. Fast alle GPI-Proteine sind an der apikalen Membran lokalisiert, was eine Rolle des GPI-Ankers bei der Sortierung der Proteine zur apikalen Membran vermuten lässt. Fusioniert man Proteine, die normalerweise im Nukleus vorkommen, mit einem GPI-Anker, werden sie zur apikalen Membran transportiert [Lisanti et al., 1989]. Der molekulare Mechanismus konnte jedoch bislang nicht geklärt werden. Es wurde postuliert, dass für das Sortieren der GPI-Proteine Transmembran-Proteine benötigt werden, da der Glycolipid-Gehalt des GPI-Proteins eine direkte Interaktion mit der cytoplasmatischen Sortierungsmaschinerie nicht erlauben würde [Varki et al., 1999].

In Zellen, die mit einem GPI-GFP-Konstrukt stabil transfiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des Proteins p23 durch siRNS zu einer verspäteten Lokalisation des GPI-GFP an der Membran führte. P23 gehört zur p24-Proteinfamilie, die aus kleinen Membranproteinen besteht, die vermutlich heteromere Komplexe bilden. Die Mitglieder dieser Familie spielen eine Rolle beim vesikulären Transport vom ER zum Golgi-Apparat. Bislang sind dies die einzigen Proteine, für die eine Rolle beim Transport von humanen GPI-Proteinen diskutiert wird.

Nicht nur GPI-Proteine können von anderen Proteinen abhängig sein, um ihren Lokalisationsort zu erreichen. Interessanterweise wird für Polycystin-1 ebenfalls eine Rolle in der Proteinprozessierung diskutiert. Die NaK-ATPase ist normalerweise in der basolateralen Membran lokalisiert, wird jedoch in ADPKD-Patienten mit mutiertem Polycystin-1 zur apikalen Membran transportiert. Da eine Interaktion der α -Untereinheit der NaK-ATPase mit Polycystin-1 gezeigt wurde, könnte die falsche Lokalisation dieses Proteins auf eine fehlende Interaktion mit Polycystin-1 zurückgeführt werden [Zatti et al., 2005]. Auch für Polycystin-2 wurde gezeigt, dass es ohne Polycystin-1 nicht zur Membran gelangen kann, sondern im Cytoplasma akkumuliert [Hanaoka et al., 2000].

Es ist denkbar, dass die Interaktion zwischen Uromodulin und Polyduktin die Funktion erfüllt, Uromodulin zur apikalen Membran zu transportieren. Diese Theorie wird durch die Tatsache unterstützt, dass in Patienten, in denen der C-Terminus von Polyduktin fehlt, eine signifikant erniedrigte Menge an Uromodulin in der Membran vorhanden ist. Die Gesamtmenge an Uromodulin ist ebenfalls deutlich erniedrigt. Außerdem können kaum noch vesikelartige, für Uromodulin positive Strukturen im Cytoplasma beobachtet werden, was vermuten lässt dass Uromodulin abgebaut wird, wenn es nicht zur Zellmembran transportiert werden kann.

In Patienten, in denen auf einem PKHD1-Allel eine trunkierende Mutation und auf dem anderen eine Punktmutation vorliegt, die zu einem Aminosäureaustausch führt, könnte das Polyduktin mit dem Aminosäureaustausch möglicherweise weiterhin einen Rolle beim Transport von Uromodulin übernehmen, solange die Aminosäuren, die für die Bindung benötigt werden, nicht betroffen sind.

In drei Fällen, bei denen es sich um doppelte Abbruchmutationen (Ex32: 320fsX1322 homozygot, Ex20: W646X/Ex61: Q3392X bzw. Ex32: R1419X homozygot) handelt, ist noch ein Signal vorhanden, wenngleich signifikant schwächer als bei der Kontrollniere. Möglicherweise können Spleißvarianten von Polyduktin, die die Mutation nicht beinhalten, einen Transport gewährleisten.

Polyduktin scheint essentiell für den Transport von Uromodulin zu sein, da bei einem Patienten mit einer homozygoten Abbruchmutation Ex61: R3482X gar kein Uromodulin mehr nachweisbar ist. Wären noch andere Proteine in den Transport involviert, hätte man auch hier eine geringe Menge von Uromodulin beobachten können.

Wie wichtig die Lokalisation von Uromodulin an der Membran ist, wird dadurch gezeigt, dass Mutationen, die Uromodulin im ER festhalten Uromodulin-assoziierte Erkrankungen und glomerulozystische Nierenerkrankung verursachen [Bernascone et al., 2006].

Möglicherweise wird die Interaktion zwischen Polyduktin und Uromodulin außerdem für die richtige Lokalisation von Polyduktin an der Zellmembran benötigt. Die immunohistochemischen Untersuchungen für Polyduktin auf Nierengewebe von UMOD-Patienten, welche zu einer Mutation bzw. einer Trunkierung der Aminosäure 419 bis 444 führt, könnte über diesen Sachverhalt Aufschluss geben. Diese Untersuchungen sind jedoch schwierig durchzuführen, da die Krankheit mit einer niedrigen Inzidenz auftritt und daher das Biopsiematerial rar ist.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass eine Interaktion zwischen den Aminosäuren 419 bis 444 von Uromodulin mit dem cytoplasmatischen C-terminalen Bereich von Polyduktin stattfindet. Diese Interaktion findet möglicherweise während der Prozessierung der beiden Proteine über den sekretorischen Weg statt und dient der Lokalisation von Uromodulin an der apikalen Membran. Abbildung 4.1 zeigt ein Modell dieser Theorie.

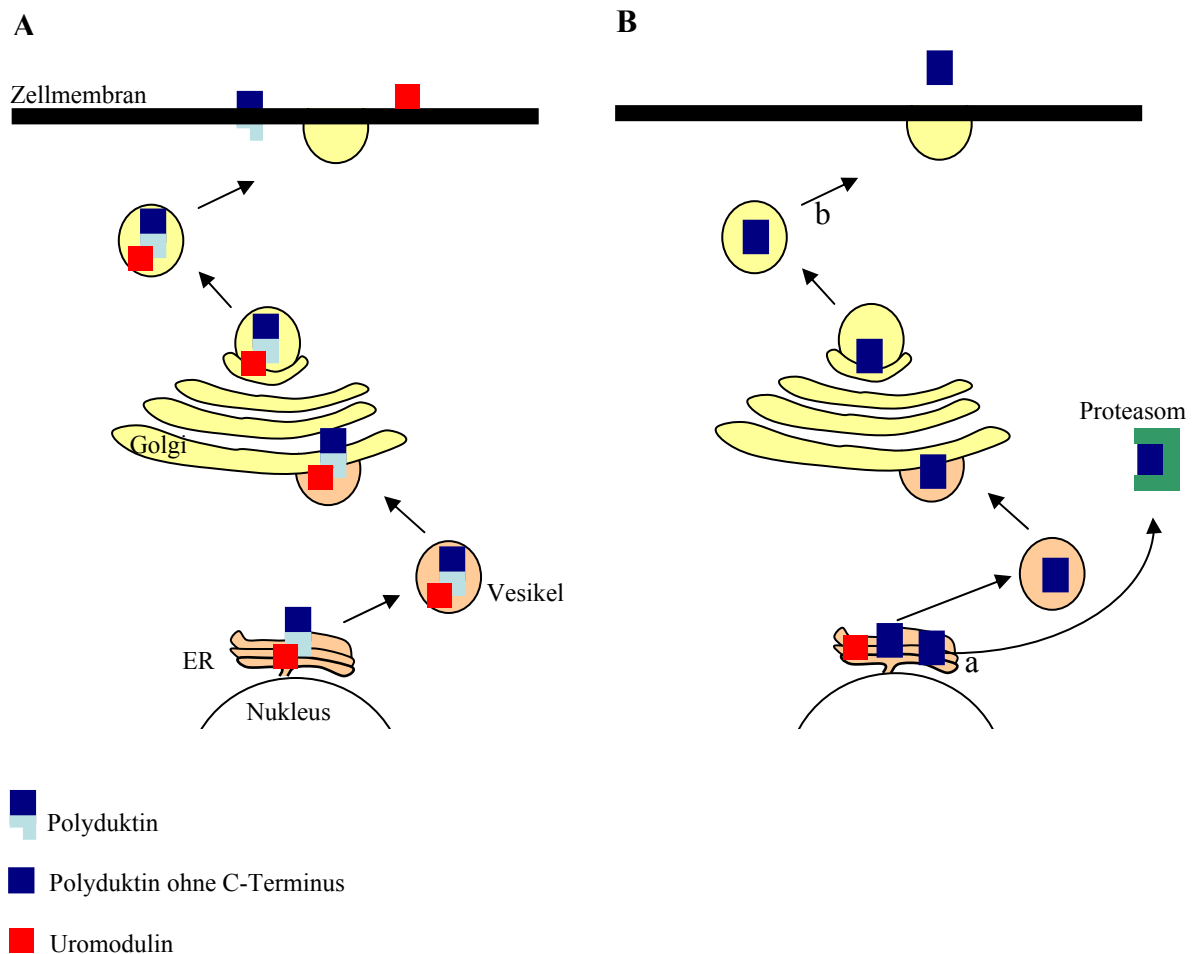


Abb. 4.1: Modell der möglichen physischen Interaktion zwischen Uromodulin und Polyduktin

A) Polyduktin und Uromodulin werden gemeinsam prozessiert. Im ER und/oder dem Golgi-Apparat interagieren die beiden Proteine. Zusammen werden die beiden Proteine über Vesikel vom ER zum Golgi-Apparat und vom Golgi-Apparat zur apikalen Zellmembran transportiert. B) Bei ARPKD-Patienten mit trunkiertem Polyduktin-Protein kann eine Bindung von Uromodulin und Polyduktin nicht mehr stattfinden. Uromodulin verbleibt größtenteils im ER. Die weitere Prozessierung von Polyduktin kann auf verschiedenen Wegen verlaufen: a) Retention: Die richtige Konformation des Proteins kann aufgrund der Trunkierung nicht hergestellt werden und das Protein bleibt im ER. Letzendlich wird eine Degradation durch das Proteasom erfolgen. b) Sezernierung: Polyduktin wird weiter prozessiert und in einem Vesikel zur Membran transportiert. Alle bekannten ARPKD-Abbruchmutationen führen zu einer Trunkierung des Proteins vor der Transmembrandomäne. Dies hat zur Folge, dass das Protein nicht in die Membran eingebaut, sondern sezerniert wird.

6. Ausblick

In den letzten Jahren wurde umfangreich an verschiedenen polyzystischen Erkrankungen geforscht. Immer mehr Daten weisen auf einen Zusammenhang zwischen den verschiedenen Proteinen, die bei diesen Erkrankungen mutiert sind, hin. Dies gilt sowohl für eine Kolo-kalisation der Proteine, von denen vermutet wird, dass sie einen großen Proteinkomplex bilden [Delous et al., 2007; Attanasio et al., 2007], als auch für Interaktionen zwischen den

verschiedenen Proteinen [Hanaoka et al., 2000; Otto et al., 2003; Olbrich et al., 2003; Arts et al., 2007]. Dies weist auf gemeinsame Signaltransduktionswege hin. Bislang sind jedoch die molekularen Mechanismen dieser potentiellen gemeinsamen Signaltransduktionswege weitgehend ungeklärt.

Auch die Funktion von Polyduktin ist bislang ungeklärt. Das Hefe-zwei-Hybrid-System stellt ein unerlässliches Werkzeug um interagierende Proteine zu identifizieren dar. Dies würde wichtige Anhaltspunkte bei der Suche nach der Funktion von Polyduktin liefern. Indem man eruiert in welche Signalwege Polyduktin involviert ist, kann auf seine Funktion während der Entwicklung der Nierenstrukturen und in ausdifferenziertem Gewebe geschlossen werden.

Zudem könnte dieses Wissen dazu beitragen ein schnelles, einfaches und kostengünstiges diagnostisches Verfahren zu entwickeln, damit früh eine spezifische ARPKD-Diagnose gewährleistet wird.

Die Erkenntnisse der molekularen Mechanismen in die Polyduktin involviert ist, sind unerlässlich für ein besseres Verständnis von ARPKD und insbesondere für die Identifizierung von möglichen therapeutischen Zielen und damit auf lange Sicht die Entwicklung von Therapien.

Indem man nicht nur die Funktion von Polyduktin, sondern auch die der verschiedenen Proteine, die in anderen polyzystischen Nierenerkrankungen betroffen sind, aufklärt, kann ermittelt werden inwieweit die Proteine miteinander interagieren und Einfluss aufeinander nehmen. Es könnten so wichtige Einsichten in die Entstehung und Entwicklung von polyzystischen Nieren gewonnen werden.

V. Literaturverzeichnis

A

Adeva M., El-Yousse M., Rosseti S., Kamath P. S., Kubly V., Consugar M. B., Milliner D. M., King B. F., Torres V.E. und Harris P. C., Clinical and molecular characterization defines a broadened spectrum of autosomal recessive polycystic kidney disease, *Medicine*, 2006, 85(1): 1-21

Antignac C., Arduy C. H., Beckmann J. S., Benessy F., Gros F., Medhioub M., Hildebrandt F., Dufier J. L., Kleinknecht C. und Broeyer M., A gene for familial juvenile nephronophthisis (recessive medullary cystic kidney disease) maps to chromosome 2p, *Nature Genetics*, 1993, 3(4): 342-345

Arnould T., Kim E., Tsiokas L., Jochimsen F., Grüning W., Chang J. D. und Walz G., The polycystic kidney disease 1 gene product mediates protein kinase C alpha-dependent and c-Jun N-terminal kinase-dependent activation of the transcription factor AP-1, *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(11): 6013-6008

Arts H. H., Doherty D., van Beersum S. E., Parisi M. A., Letteboer S. J., Gorden N. T., Peters T. A., Märker T., Voesenek K., Kartono A., Ozyurek H., Farin F. M., Kroes H. Y., Wolfrum U., Brunner H. G., Cremers F. P., Glass I. A., Knoers N. V. und Roepman R., Mutations in the gene encoding the basal body protein RPGRIP1L, a nephrocystin-4 interactor, cause Joubert syndrome, *Nature Genetics*, 2007, 39(7): 882-888

Attanasio M., Uhlenhaut N. H., Sousa V. H., O'Toole J. F., Otto E., Anlag K., Klugmann C., Treier A. C., Helou J., Sayer J. A., Seelow D., Nürnberg G., Becker C., Chudley A. E., Nürnberg P., Hildebrandt F. und Treier M., Loss of GLIS2 causes nephronophthisis in humans and mice by increased apoptosis and fibrosis, *Nature Genetics*, 2007, 39(8): 1018-1024

Avner E. D., Studnicki F. E., Young M. C., Sweeney W. E. Jr., Piesco N. P., Ellis D. und Fettermann G. H., Congenital murine polycystic kidney disease I. The ontogeny of tubular cyst formation, *Pediatric Nephrology*, 1987, 1(4): 587-596

B

Bachmann S., Koeppen-Hagemann I. und Kriz W., Ultrastructural localization of Tamm-Horsfall glycoprotein (THP) in rat kidney as revealed by protein A-gold immunocytochemistry, *Histochemistry*, 1985, 83(6): 531-538

Bartel P. L., Chien C.-T., Sternglanz R. und Fields S., Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system, *BioTechniques*, 1993, 14: 920-924

Benzing T., Gerke P., Höpker K., Hildebrandt F., Kim E., und Walz G., Nephrocystin interacts with Pyk2, p130Cas, and tensin and triggers phosphorylation of Pyk2, *Proceedings of the national academy of sciences of the USA*, 2001, 98: 9784-9789

Bergmann C., Senderek J., Sedlacek B., Pegiazoglou I., Puglia P., Eggermann T., Rudnik-Schöneborn S., Furu L., Onuchic L. F., De Baca M., Germino G. G., Guay-Woodford L., Somlo S., Moser M., Büttner R. und Zerres K., Spectrum of mutations in the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD/PKHD1), *Journal of the American Society of Nephrology*, 2003, 14(1): 76-89

Bergmann C., Senderek J., Windelen E., Küpper F., Middeldorf I., Schneider F., Dornia C., Rudnik-Schöneborn S., Konrad M., Schmitt C. P., Seeman T., Neuhaus T. J., Vester U., Kirfel J., Büttner R., Zerres K. und APN (Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie), Clinical consequences of PKHD1 mutations in 164 patients with autosomal-recessive polycystic kidney disease (ARPKD), *Kidney International*, 2005, 67(3): 829-848

Bernascone I., Vavassori S., Di Pentima A., Santambrogio S., Lamorte G., Amoroso A., Scolari F., Ghiggeri G. M., Casari G., Polishchuk R. und Rampoldi L., Defective intracellular trafficking of uromodulin mutant isoforms, *Traffic*, 2006, 7(11): 1567-1579

Bhunja A. K., Piontek K., Boletta A., Liu L., Qian F., Xu P. N., Germino F. J. und Germino G. G., PKD1 induces p21^(waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2, *Cell*, 2002, 109(2): 157-168

Bingham C., Bulman M. P., Ellard S., Allen L. I., Lipkin G. W., Hoff W. G., Woolf A. S., Rizzoni G., Novelli G., Nicholls A. J. und Hattersley A. T., Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene are associated with familial hypoplastic glomerulocystic kidney disease, *American Journal of Human Genetics*, 2001, 68: 219–224

Birnboim H. C. und Doly J., A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Research*, 1979, 7(6): 1513-1523

Burtey S. J., Riera M. und Fontés M., Overexpression of complement-component genes in Han:SPRD rats a model of polycystic kidney disease, *Kidney international*, 2008, 73: 1324-1325

C

Campbell N. A., Biologie, *Spektrum Verlag*, 1997, erste deutsche Auflage

Cavallone D., Malagolini N. und Serafini-Cessi F., Mechanism of release of urinary Tamm-Horsfall glycoprotein from the kidney GPI-anchored counterpart, *Biochemical and Biophysical research communications*, 2001, 280: 110-114

Chang B., Khanna H., Hawes N., Jimeno D., He S., Lillo C., Parapuram S. K., Cheng H., Scott A., Hurd R. E., Sayer J. A., Otto E. A., Attanasio M., O'Toole J. F., Jin G., Shou C., Hildebrandt F., Williams D. S., Heckenlively J. R. und Swaroop A., In-frame deletion in a novel centrosomal/ciliary protein CEP290/NPHP6 perturbs its interaction with RPGR and results in early-onset retinal degeneration in the rd16 mouse, *Human Molecular Genetics*, 2006, 15(11): 1847-1857

Chaplin T., Ayton P., Bernard O. A., Saha V., Valle V. D., Hillion J., Gregorini A., Lillington D., Berger R. und Young B. D., A novel class of zinc finger/leucine zipper genes identified from the molecular cloning of the t(10;11) translocation in acute leukemia, *Blood*, 1995, 85: 1435-1441

Chauvet V., Tian X., Husson H., Grimm D. H., Wang T., Hiesberger T., Igarashi P., Bennett A. M., Ibraghimov-Beskrovnaya O., Somlo S. und Caplan M. J., Mechanical stimuli induce cleavage and nuclear translocation of the polycystin-1 C terminus, *Journal of Clinical Investigation*, 2004, 114(10): 1433-1443

Churchill D. N., Bear J. C., Morgan J., Payne R. H., McManamon P. J. und Gault M. H., Prognosis of adult onset polycystic kidney disease reevaluated, *Kidney International*, 1984, 26(2): 190-193

Conciliis L. D., Marchitello A., Wapenaar M. C., Borsani L. G., Giglio S., Mariani M., Consalez G. G., Zuffardi O., Franco B., Ballabio A. und Banfi S., Characterization of Cxorf5 (71-7A), a novel human cDNS mapping to Xp22 and encoding a protein containing coiled-coil α -helical domains, *Genomics*, 1998, 51: 243–250

D

Delous M., Baala L., Salomon R., Laclef C., Vierkotten J., Tory K., Golzio C., Lacoste T., Besse L., Ozilou C., Moutkine I., Hellman N. E., Anselme I., Silbermann F., Vesque C., Gerhardt C., Rattenberry E., Wolf M. T., Gubler M. C., Martinovic J., Encha-Razavi F., Boddaert N., Gonzales M., Macher M. A., Nivet H., Champion G., Berthélémy J. P., Niaudet P., McDonald F., Hildebrandt F., Johnson C. A., Vekemans M., Antignac C., Rüther U., Schneider-Maunoury S., Attié-Bitach T. und Saunier S., The ciliary gene RPGRIP1L is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome, *Nature Genetics*, 2007, 39(7): 875-881

DiMartino J. F., Ayton P. M., Chen E. H., Naftzger C. C., Young B. D. und Cleary M. L., The AF10 leucine zipper is required for leukemic transformation of myeloid progenitors by MLL-AF10, *Blood*, 2002, 99(10): 3780-3785

Dixon-Salazar T., Silhavy J. L., Marsh S. E., Louie C. M., Scott L. C., Gururaj A., Al-Gazali L., Al-Tawari A. A., Kayserili H., Sztriha L. und Gleeson J. G., Mutations in the AHI1 gene, encoding jouberin, cause Joubert syndrome with cortical polymicrogyria, *American Journal of Human Genetics*, 2004, 75(6): 979-987

Donaldson J. C., Dempsey P. J., Reddy S., Bouton A. H., Coffey R. J. und Hanks S. K., Crk-associated substrate p130(Cas) interacts with nephrocystin and both proteins localize to cell-cell contacts of polarized epithelial cells, *Experimental Cell Research*, 2000, 256(1): 168-178

Drews U., Taschenatlas der Embryologie, *Georg Thieme Verlag*, 1993, 1. Auflage

E

Eley L., Gabrielides C., Adams M., Johnson C. A., Hildebrandt F. und Sayer J.A., Joubertin localizes to collecting ducts and interacts with nephrocystin-1, *Kidney International*, 2008, elektronische Publikation vorab

F

Ferrante M. I., Giorgio G., Feather S. A., Bulfone A., Wright V., Ghiani M., Selicorni A., Gammaro L., Scolari F., Woolf A. S., Sylvie O., Bernard L., Malcolm S., Winter R., Ballabio A. und Franco B., Identification of the gene for oral-facial-digital type I syndrome, *American Journal of Human Genetics*, 2001, 68(3): 569-576

Fields S. und Song O., A novel genetic system to detect protein-protein interactions, *Nature*, 1989, 340(6230): 245-246

Furu L., Onuchic L. F., Gharavi A., Hou X., Esquivel E. L., Nagasawa Y., Bergmann C., Senderek J., Avner E., Zerres K., Germino G. G., Guay-Woodford L. M. und Somlo S., Milder presentation of recessive polycystic kidney disease requires presence of amino acid substitution mutations, *Journal of the American Society of Nephrology*, 2003, 14(8): 2004-2014

G

Gabow P. A., Autosomal dominant polycystic kidney disease, *The new England journal of medicine*, 1993, 329(5): 332-342

Gagnadoux M. F., Habib R., Levy M., Brunelle F. und Broyer M., Cystic renal diseases in children, *Advances in nephrology from the Necker Hospital*, 1989, 18: 33-57

Gallagher A. R., Esquivel E. L., Briere T. S., Tian X., Mitobe M., Menezes L. F., Markowitz G. S., Jain D., Onuchic L. F. und Somlo S., Biliary and pancreatic dysgenesis in mice harboring a mutation in Pkhd1, *American Journal of Clinical Pathology*, 2008, 172(2): 417-429

Garred P., Hetland G., Mollnes T. E. und Stoervold G., Synthesis of C3, C5, C6, C7, C8, and C9 by human fibroblasts, *Scandinavian Journal of Immunology*, 1990, 32(5): 555-60

Gasque P., Fontaine M. und Morgan B. P., Complement expression in human brain. Biosynthesis of terminal pathway components and regulators in human glial cells and cell lines, *The Journal of Immunology*, 1995, 154: 4726-4733

Geng L., Burrow C. R., Li H. P. und Wilson P. D., Modification of the composition of polycystin-1 multiprotein complexes by calcium and tyrosine phosphorylation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1535(1): 21-35

Georgas K., Rumballe B., Wilkinson L., Chiu H. S., Lesieur E., Gilbert T. und Little M. H., Use of dual section mRNS in situ hybridisation/immunohistochemistry to clarify gene expression patterns during the early stages of nephron development in the embryo and in the mature nephron of the adult mouse kidney, *Histochemistry and Cell Biology*, 2008, elektronische Publikation vorab

Gilbert S. F., Developmental biology, *Sinauer associates incorporated*, 2000, 6. Auflage

Gilbert-Barness E., Potter's Pathology of the fetus, infant and child, *Mosby-Elsevier*, 2007, 2. Auflage

Giorgio G., Alfieri M., Prattichizzo C., Zullo A., Cairo S. und Franco B., Functional characterization of the OFD1 protein reveals a nuclear localization and physical interaction with subunits of a chromatin remodeling complex, *Molecular Biology of the Cell*, 2007, 18(11): 4397-4404

González-Perrett S., Kim K., Ibarra C., Damiano A. E., Zotta E., Batelli M., Harris P. C., Reisin I. L., Arnaout M. A. und Cantiello H. F., Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca²⁺-permeable nonselective cation channel, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2001, 98(3): 1182-1187

Gresh L., Fischer E., Reimann A., Tanguy M., Garbay S., Shao X., Hiesberger T., Fiette L., Igarashi P., Yaniv M. und Pontoglio M., A transcriptional network in polycystic kidney disease, *EMBO Journal*, 2004, 23(7): 1657-1668

Guay-Woodford L. M., Muecher G., Hopkins S. D., Avner E. D., Germino G. G., Guillot A. P., Herrin J., Holleman R., Irons D. A., Primack W., Thomson P. D., Waldo F. B., Lunt P. W. und Zerres K., The severe perinatal form of autosomal recessive polycystic kidney disease maps to chromosome 6p21.1-p12: implications for genetic counseling, *American Journal of Human Genetics*, 1995, 56(5): 1101-1107

Guo N., Krutzsch H. C., Inman J. K. und Roberts D. D., Thrombospondin 1 and type I repeat peptides of thrombospondin 1 specifically induce apoptosis of endothelial cells, *Cancer Research*, 1997, 57(9): 1735-1742

H

Hanaoka K., Qian F., Boletta A., Bhunia A. K., Piontek K., Tsiokas L., Sukhatme V. P., Guggino W. B. und Germino G. G., Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents, *Nature*, 2000, 408(6815): 990-994

Hänsch G. M., Hammer C. H., Vanguri P. und Shin M. L., Homologous species restriction in lysis of erythrocytes by terminal complement proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1981, 78(8): 5118-5121

Hart T. C., Gorry M. C., Hart P. S., Woodard A. S., Shihabi Z., Sandhu J., Shirts B., Xu L., Zhu H., Barmada M. M. und Bleyer A. J., Mutations of the UMOD gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy, *Journal of Medical Genetics*, 2002, 39(12): 882-892

Herman J. P., Dolgas C.M., Rucker D. und Langub M. C. Jr., Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNAs in the rat brain, *Journal of Comparative Neurology*, 1996, 369(2): 165-87

Hetland G., Johnson E., Falk R. J. und Eskeland T., Synthesis of complement components C5, C6, C7, C8 and C9 in vitro by human monocytes and assembly of the terminal complement complex, *Scandinavian Journal of Immunology*, 1986, 24(4): 421-428

Hetland G., Johnson E., Røyset P. und Eskeland T., Human alveolar macrophages and monocytes generate the functional classical pathway of complement in vitro, *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 1987, 95(3): 117-122

Hiesberger T., Bai Y., Shao X., McNally B. T., Sinclair A. M., Tian X., Somlo S. und Igarashi P., Mutation of hepatocyte nuclear factor-1beta inhibits Pkhd1 gene expression and produces renal cysts in mice, *Journal of Clinical Investigation*, 2004, 113(6): 814-825

Hiesberger T., Gourley E., Erickson A., Koulen P., Ward C. J., Masyuk T. V., Larusso N. F., Harris P. C. und Igarashi P., Proteolytic cleavage and nuclear translocation of fibrocystin is regulated by intracellular Ca²⁺ and activation of protein kinase C, *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(45): 34357-34364

Hildebrandt F. und Otto E., Molecular genetics of nephronophthisis and medullary cystic kidney disease, *Journal of the american society of nephrology*, 2000, 11: 1753-1761

Hildebrandt F. und Zhou W., Nephronophthisis-associated ciliopathies, *Journal of the American Society of Nephrology*, 2007, 18: 1855–1871

Hildebrandt F., Singh-Sawhney I., Schnieders B., Centofante L., Omran H., Pohlmann A., Schmaltz C., Wedekind H., Schubotz C., Antignac C., Weber J. L., Brandis M., und Mitglieder der „APN Study Group“, Mapping of a gene for familial juvenile nephronophthisis: refining the map and defining flanking markers on chromosome 2, *American society of human genetics*, 1993, 53: 1256-1261

Hirsch J. R., Kruhøffer M., Adermann K., Heitland A., Maronde E., Meyer M., Forssmann W. G., Herter P., Plenz G. und Schlatter E., Cellular localization, membrane distribution, and possible function of guanylyl cyclases A and 1 in collecting ducts of rat, *Cardiovascular Research*, 2001, 51(3): 553-561

Hobart M. J., Fernie B. A. und DiScipio R. G., Structure of the human C7 gene and comparison with the C6, C8A, C8B, and C9 genes, *The Journal of Immunology*, 1995, 154: 5188-5194

Hodaňová K., Majewski J., Kublová M., Vyletal P., Kalbáčová M., Stibůrková B., Hůlková H., Chagnon Y. C., Lanouette C.-M., Marinaki A., Fryns J.-P., Venkat-Raman G. und Kmoch S., Mapping of a new candidate locus for uromodulin-associated kidney disease (UAKD) to chromosome 1q41, *Kidney international*, 2005, 68: 1472-1482

Hou X., Mrug M., Yoder B. K., Lefkowitz E. J., Kremmidiotis G., D'Eustachio P., Beier D. R. und Guay-Woodford L. M., Cystin, a novel cilia-associated protein, is disrupted in the cpk mouse model of polycystic kidney disease, *Journal of Clinical Investigation*, 2002, 109(4): 533-540

Huan Y. und van Adelsberg J., Polycystin-1, the PKD1 gene product, is in a complex containing E-cadherin and the catenins, *Journal of Clinical Investigation*, 1999, 104(10): 1459-1468

Hughes J., Ward C. J., Peral B., Aspinwall R., Clark K., San Millán J. L., Gamble V. und Harris P. C., The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains, *Nature genetics*, 1995, 10: 151-160

I

Ibraghimov-Beskrovnaya O. und Bukanov N., Polycystic kidney diseases: From molecular discoveries to targeted therapeutic strategies, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65: 605–619

Ibraghimov-Beskrovnaya O., Dackowski W. R., Foggensteiner L., Coleman N., Thiru S., Petry L. R., Burn T. C., Connors T. D., Van Raay T., Bradley J., Qian F., Onuchic L. F., Watnick T. J., Piontek K., Hakim R. M., Landes G. M., Germino G. G., Sandford R. und Klinger K. W., Polycystin: In vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein, *Proceedings of the national academy of sciences of the USA*, 1997, 94(12): 6397-6402

Iruela-Arispe M. L., Lombardo M., Krutzsch H. C., Lawler J. und Roberts D. D., Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats, *Circulation*, 1999, 100(13): 1423-1431

Ito H., Fukuda Y., Murata K. und Kimura A., Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations, *Journal of Bacteriology*, 1983, 153(1): 163-168

Iwabuchi K., Li B., Bartel P. und Fields S., Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization, *Oncogene*, 1993, 8: 1693-1696

J

Jovine L., Qi H., Williams Z., Litscher E. und Wassarman P. M., The zp domain is a conserved module for polymerisation of extracellular proteins, *Nature cell biology*, 2002, 4: 457-461

K

Kääriäinen H., Jääskeläinen J., Kivisaari L., Koskimies O., Rapola J. und Norio R., Polycystic kidney disease in children: differential diagnosis between the dominantly and recessively inherited forms, *Progress in clinical and biological research*, 1989, 305: 55-59

Kaimori J. Y., Nagasawa Y., Menezes L. F., Garcia-Gonzalez M. A., Deng J., Imai E., Onuchic L. F., Guay-Woodford L. M. und Germino G. G., Polyductin undergoes notch-like processing and regulated release from primary cilia, *Human Molecular Genetics*, 2007, 16(8): 942-956

Kaplan B. S., Fay J., Shah V., Dillon M. J. und Barratt T. M., Autosomal recessive polycystic kidney disease, *Pediatric Nephrology*, 1989, 3(1): 43-49

Kilgore K. S., Schmid E., Shanley T. P., Flory C. M., Maheswari V., Tramontini N. L., Cohen H., Ward P. A., Friedl H. P. und Warren J. S., Sublytic concentrations of the membrane attack complex induce endothelial Interleukin-8 and Monocyte chemoattractant protein-1 through nuclear factor- κ B activations, *American Journal of Pathology*, 1997, 150(6): 2019-2031

Kim E., Arnould T., Sellin L. K., Benzing T., Fan M. J., Grüning W., Sokol S. Y., Drummond I. und Walz G., The polycystic kidney disease 1 gene product modulates Wnt signaling, *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(8): 4947-4953

Kim I., Fu Y., Hui K., Moeckel G., Mai W., Li C., Liang D., Zhao P., Ma J., Chen X. Z., George A. L. Jr., Coffey R. J., Feng Z. P. und Wu G., Fibrocystin/polyductin modulates renal tubular formation by regulating polycystin-2 expression and function, *Journal of the American Society of Nephrology*, 2008, 19: 455-468

Kleppel M. M., Santi P. A., Douglas T. J., Jorgen C. T., Wieslander L. und Michael A. F., Human tissue distribution of novel basement membrane collagen, *American Journal of Pathology*, 1989, 134(4)

Konrad M., Saunier S., Heidet L., Silbermann F., Benessy F., Calado J., Le Paslier D., Broyer M., Gubler M. C. und Antignac C., Large homozygous deletions of the 2q13 region are a major cause of juvenile nephronophthisis, *Human molecular genetics*, 1996, 5: 367-371

Koptides M., Mean R., Stavrou C., Pierides A., Demetriou K., Nakayama T., Hildebrandt F., Fuchshuber A. und Deltas C. C., Novel NPR1 polymorphic variants and its exclusion as a candidate gene for medullary cystic kidney disease (ADMCKD) type 1, *Molecular and Cellular Probes*, 2001, 15(6): 357-361

Koulen P., Cai Y., Geng L., Maeda Y., Nishimura S., Witzgall R., Ehrlich B. E. und Somlo S., Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel, *Nature Cell Biology*, 2002, 4(3): 191-197

Kuhn M., Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A, *Circulation Research*, 2003, 93(8): 700-709

L

Laemmli U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685

Lal M., Song X., Pluznick J. L., Di Giovanni V., Merrick D. M., Rosenblum N. D., Chauvet V., Gottardi C. J., Pei Y. und Caplan M. J., Polycystin-1 C-terminal tail associates with β -catenin and inhibits canonical Wnt signaling, *Human Molecular Genetics*, 2008, elektronische Publikation vorab

Langelegen H., Pausa M., Johnson E., Casarsa C. und Tedesco F., The endothelium is an extrahepatic site of synthesis of the seventh component of the complement system, *Clinical & Experimental Immunology*, 2000, 121: 69-76

Lens X. M., Banet J. F., Outeda P. und Barrio-Lucía V., A novel pattern of mutation in uromodulin disorders: autosomal dominant medullary cystic kidney disease type 2, familial juvenile hyperuricemic nephropathy, and autosomal dominant glomerulocystic kidney disease, *American Journal of Kidney Diseases*, 2005, 46(1): 52-57

Li B. und Fields S., Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 T antigen by using the yeast-two-hybrid system, *The journal of the federation of american societies for experimental biology*, 1993, 7: 957-963

Li Q., Montalbetti N., Shen P. Y., Dai X. Q., Cheeseman C. I., Karpinski E., Wu G., Cantiello H. F. und Chen X. Z., Alpha-actinin associates with polycystin-2 and regulates its channel activity, *Human Molecular Genetics*, 2005, 14(12): 1587-1603

Linder B., Jones L. K., Chaplin T., Mohd-Sarip A., Heinlein U. A. O., Young B. D. und Saha V., Expression pattern and cellular distribution of the murine homologue of AF10, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1998, 1443: 285-296

Linder B., Newman R., Jones, L. K., Debernardi S., Young B. D., Freemont P., Verrijzer C. P. und Saha V., Biochemical analyses of the AF10 protein: the extended LAP/PHD-finger mediates oligomerisation, *Journal of Molecular Biology*, 2000, 299: 369-378

Lisanti M. P., Caras I. W., Davitz M. A. und Rodriguez-Boulon E., A glycosphospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells, *Journal of Cell Biology*, 1989, 109(5):2145-2156

Lowe D. G., Chang M. S., Hellmiss R., Chen E., Singh S., Garbers D. L. und Goeddel D. V., Human atrial natriuretic peptide receptor defines a new paradigm for second messenger signal transduction, *EMBO Journal*, 1989, 8(5): 1377-1384

M

Masyuk T. V., Huang B. Q., Ward C. J., Masyuk A. I., Yuan D., Splinter P. L., Punyashthiti R., Ritman E. L., Torres V. E., Harris P. C. und LaRusso N. F., Defects in cholangiocyte fibrocystin expression and ciliary structure in the PCK rat, *Gastroenterology*, 2003, 125: 1303-1310

Menezes L. F. C., Cai Y., Nagasawa Y., Silva A. M. G., Watkins M. L., da Silva A. M., Somlo S., Guay-Woodford L.-M., Germino G. G. und Onuchic L. F., Polyductin, the *PKHD1* gene product, comprises isoforms expressed in plasma membrane, primary cilium, and cytoplasm, *Kidney International*, 2004, 66: 1345-1355

Mochizuki T., Wu G., Hayashi T., Xenophontos S. L., Veldhuisen B., Saris J. J., Reynolds D. M., Cai Y., Gabow P. A., Pierides A., Kimberling W. J., Breuning M. H., Deltas C. C., Peters D. J. und Somlo S., PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein, *Science*, 1996, 272(5266): 1339-1342

Mollet G., Salomon R., Gribouval O., Silbermann F., Bacq D., Landthaler G., Milford D., Nayir A., Rizzoni G., Antignac C. und Saunier S., The gene mutated in juvenile nephronophthisis type 4 encodes a novel protein that interacts with nephrocystin, *Nature genetics*, 2002, 32(2): 300-305

Moser M., Matthiesen S., Kirfel J., Schorle H., Bergmann C., Senderek J., Rudnik-Schöneborn S., Zerres K. und Buettner R., A mouse model for cystic biliary dysgenesis in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD), *Hepatology*, 2005, 41(5):1113-1121

Mrug M., Zhou J., Woo Y., Cui X., Szalai A. J., Novak J., Churchill G. A. und Guay-Woodford L.-M., Overexpression of innate immune response genes in a model of recessive polycystic kidney disease, *Kidney International*, 2008, 73(1): 63-76

Mücher G., Wirth B. und Zerres K., Refining the map and defining flanking markers of the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease on chromosome 6p21.1-p12, *American Journal of Human Genetics*, 1994, 55(6): 1281-1284

Murakami S., Nagaya N., Itoh T., Fujii T., Iwase T., Hamada K., Kimura H. und Kangawa K., C-type natriuretic peptide attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice, *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2004, 287(6): L1172-L1177

Muskhelishvili L., Thompson P. A., Kusewitt D. F., Wang C. und Kadlubar F. F., In situ hybridization and immunohistochemical analysis of cytochrome P450 1B1 expression in human normal tissues, *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2001, 49 (2): 229-236

N

Nadasdy T., Laszik Z., Lajoie G., Blick K. E., Wheeler D. E. und Silva F. G., Proliferative activity of cyst epithelium in human renal cystic diseases, *Journal of the American society of Nephrology*, 1995, 5: 340-348

Nagano J., Kitamura K., Hujer K. M., Ward C. J., Bram R. J., Hopfer U., Tomita K., Huang C. und Miller R.T., Fibrocystin interacts with CAML, a protein involved in Ca^{2+} signaling, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 338(2): 880-889

Nagasawa Y., Matthiesen S., Onuchic L. F., Hou X., Bergmann C., Esquivel E., Senderek J., Ren Z., Zeltner R., Furu L., Avner E., Moser M., Somlo S., Guay-Woodford L.-M., Büttner R., Zerres K. und Germino G. G., Identification and characterization of Pkhd1, the mouse orthologue of the human ARPKD gene, *Journal of the American Society of Nephrology*, 2002, 13(9):2246-2258

Nagase M., Katafuchi T., Hirose S. und Fujita T., Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtypes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Journal of Hypertension*, 1997, 15(11): 1235-1243

Naughton M. A., Walport M. J., Würzner R., Carter M. J., Alexander G. J., Goldman J. M. und Botto M., Organ-specific contribution to circulating C7 levels by the bone marrow and liver in humans, *European Journal of Immunology*, 1996, 26 (9): 2108-2112

Nauli S. M., Alenghat F. J., Luo Y., Williams E., Vassilev P., Li X., Elia A. E., Lu W., Brown E. M., Quinn S. J., Ingber D. E. und Zhou J., Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells, *Nature Genetics*, 2003, 33(2): 129-137

Nauta J., Ozawa Y., Sweeney W. E. Jr., Rutledge J. C. und Avner E. D., Renal and biliary abnormalities in a new murine model of autosomal recessive polycystic kidney disease, *Pediatric Nephrology*, 1993, 7(2): 163-172

Nishimura A., Morita M., Nishimura Y. und Sugino Y., A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells, *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(20): 6169

Nürnberg J., Bacallao R. L. und Phillips C. L., Inversin forms a complex with catenins and N-cadherin in polarized epithelial cells, *Molecular and Cellular Biology*, 2002, 13(9): 3096-3106

O

Olbrich H., Fliegauf M., Hoefle J., Kispert A., Otto E., Volz A., Wolf M. T., Sasmaz G., Trauer U., Reinhardt R., Sudbrak R., Antignac C., Gretz N., Walz G., Schermer B., Benzing T., Hildebrandt F. und Omran H., Mutations in a novel gene, NPHP3, cause adolescent nephronophthisis, tapeto-retinal degeneration and hepatic fibrosis, *Nature genetics*, 2003, 34: 455-459

Onuchic L. F., Furu L., Nagasawa Y., Hou X., Eggermann T., Ren Z., Bergmann C., Senderek J., Esquivel E., Zeltner R., Rudnik-Schöneborn S., Mrug M., Sweeney W., Avner E. D., Zerres K., Guay-Woodford L. M., Somlo S. und Germino G. G., PKHD1, the polycystic kidney and hepatic disease 1 gene, encodes a novel large protein containing multiple immunoglobulin-like plexin-transcription-factor domains and parallel beta-helix 1 repeats, *American Journal of Human Genetics*, 2002, 70(5): 1305-1317

Otto E. A., Loeys B., Khanna H., Hellemans J., Sudbrak R., Fan S., Muerb U., O'Toole J. F., Helou J., Attanasio M., Utsch B., Sayer J. A., Lillo C., Jimeno D., Coucke P., De Paepe A., Reinhardt R., Klages S., Tsuda M., Kawakami I., Kusakabe T., Omran H., Imm A., Tippens M., Raymond P. A., Hill J., Beales P., He S., Kispert A., Margolis B., Williams D. S., Swaroop A. und Hildebrandt F., Nephrocystin-5, a ciliary IQ domain protein, is mutated in Senior-Loken syndrome and interacts with RPGR and calmodulin, *Nature genetics*, 2005, 37(3): 282-288

Otto E. A., Schermer B., Obara T., O'Toole J. F., Hiller K. S., Mueller A. M., Ruf1 R. G., Hoefele J., Beekmann F., Landau D., Foreman J. W., Goodship J. A., Strachan T., Kispert A., Wolf M. T., Gagnadoux M. F., Nivet H., Antignac C., Walz G., Drummond I. A., Benzing T. und Hildebrandt F., Mutations in INVS encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination, *Nature genetics*, 2003, 34: 413–420

Otto E. A., Trapp M. L., Schultheiss U. T., Helou J., Quarmby L. M. und Hildebrandt F., NEK8 mutations affect ciliary and centrosomal localization and may cause nephronophthisis, *Journal of the American Society of Nephrology*, 2008, 19(3): 418-420

P

Peach R. J., Day W. A., Ellingsen P. J. und McGiven A. R., Ultrastructural localization of Tamm-Horsfall protein in human kidney using immunogold electron microscopy, *Histochemical journal*, 1988, 20: 156-164

Pennica D., Kohr W. J., Kuang W. J., Glaister D., Aggarwal B. B., Chen E. Y. und Goeddel D.V., Identification of human uromodulin as the Tamm-Horsfall urinary glycoprotein, *Science*, 1987, 236(4797): 83-88

Pollak V. E. und Arbel C., The distribution of Tamm Horsfall mucoprotein (uromucoid) in the human nephron, *Nephron*, 1969, 6(6): 667-672

Preissner K. T., Podack E. R. und Müller-Eberhard H. J., The membrane attack complex of complement: relation of C7 to the metastable membrane binding site of the intermediate complex C5b-7, *The Journal of immunology*, 1985, 135(1)

R

Rampoldi L., Caridi G., Santon D., Boaretto F., Bernascone I., Lamorte G., Tardanico R., Dagnino M., Colussi G., Scolari F., Ghiggeri G. M., Amoroso A. und Casari G., Allelism of MCKD, FJHN and GCKD caused by impairment of uromodulin export dynamics, *Human Molecular Genetics*, 2003, 12(24): 3369-3384

Rindler M., Naik S. S., Li N., Hoops T. C. und Peraldi M. N., Uromodulin (Tamm-Horsfall Glycoprotein/Uromucoid) is a Phosphatidylinositol-linked membrane protein, *The journal of biological chemistry*, 1990, 265(34): 20784-20789

Roitbak T., Ward C. J., Harris P. C., Bacallao R., Ness S. A. und Wandinger-Ness A., A polycystin-1 multiprotein complex is disrupted in polycystic kidney disease cells, *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 15(3): 1334-1346

Romio L., Fry A. M., Winyard P. J. D., Malcolm S., Woolf A. S. und Feather S. A., OFD1 is a centrosomal/basal body protein expressed during mesenchymal-epithelial transition in human nephrogenesis, *Journal of the American Society of Nephrology*, 2004, 15: 2556-2568

Romio L., Wright V., Price K., Winyard P. J., Donnai D., Porteous M. E., Franco B., Giorgio G., Malcolm S., Woolf A. S. und Feather S. A., OFD1, the gene mutated in oral-facial-digital syndrome type 1, is expressed in the metanephros and in human embryonic renal mesenchymal cells, *Journal of the American Society of Nephrology*, 2003, 14(3): 680-689

S

Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A. und Arnheim N., Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 1985, 230(4732): 1350-1354

Salomon R., Saunier S. und Niaudet P., Nephronophthisis, *Pediatric Nephrology*, 2008, elektronische Publikation vorab

Sanger F., Nicklen S. und Coulson A. R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, 74: 5463-5470

Sanzen T., Harada K., Yasoshima M., Kawamura Y., Ishibashi M., und Nakanuma Y., Polycystic kidney rat is a novel animal model of caroli's disease associated with congenital hepatic fibrosis, *American Journal of Pathology*, 2001, 158(5): 1605-1612

Sayer J. A., Otto E. A., O'Toole J. F., Nurnberg G., Kennedy M. A., Becker C., Hennies H. C., Helou J., Attanasio M., Fausett B. V., Utsch B., Khanna H., Liu Y., Drummond I., Kawakami I., Kusakabe T., Tsuda M., Ma L., Lee H., Larson R. G., Allen S. J., Wilkinson C. J., Nigg E. A., Shou C., Lillo C., Williams D. S., Hoppe B., Kemper M. J., Neuhaus T., Parisi M. A., Glass I. A., Petry M., Kispert A., Gloy J., Ganner A., Walz G., Zhu X., Goldman D., Nurnberg P., Swaroop A., Leroux M. R. und Hildebrandt F., The centrosomal protein nephrocystin-6 is mutated in Joubert syndrome and activates transcription factor ATF4, *Nature Genetics*, 2006, 38(6): 674-681

Sharp A. M., Messiaen L. M., Page G., Antignac C., Gubler M. C., Onuchic L. F., Somlo S., Germino G. G. und Guay-Woodford L.-M., Comprehensive genomic analysis of PKHD1 mutations in ARPKD cohorts, *Journal of Medical Genetics*, 2005, 42(4): 336-349

Shi S. J., Vellaichamy E., Chin S. Y., Smithies O., Navar L. G. und Pandey K. N., Natriuretic peptide receptor A mediates renal sodium excretory responses to blood volume expansion, *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 2003, 285(4): 694-702

Sikri K. L., Foster C. L., Bloomfield F. J. und Marshall R. D., Localization by immunofluorescence and by light- and electron-microscopic immunoperoxidase techniques of Tamm-Horsfall glycoprotein in adult hamster kidney, *Biochemical Journal*, 1979, 181: 525-532

Suga S., Nakao K., Kishimoto I., Hosoda K., Mukoyama M., Arai H., Shirakami G., Ogawa Y., Komatsu Y. und Nakagawa O., Phenotype-related alteration in expression of natriuretic peptide receptors in aortic smooth muscle cells, *Circulation Research*, 1992, 71(1): 34-39

T

Tamm I. und Horsfall F. L. Jr., Characterization and separation of an inhibitor of viral hemagglutination present in urine, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1950, 74(1): 106-108

Thauvin-Robinet C., Cossée M., Cormier-Daire V., Van Maldergem L., Toutain A., Alembik Y., Bieth E., Layet V., Parent P., David A., Goldenberg A., Mortier G., Héron D., Sagot P., Bouvier A. M., Huet F., Cusin V., Donzel A., Devys D., Teyssier J. R. und Faivre L., Clinical, molecular, and genotype-phenotype correlation studies from 25 cases of oral-facial-digital syndrome type 1: a French and Belgian collaborative study, *Journal of Medical Genetics*, 2006, 43(1): 54-61

The International Polycystic Kidney Disease Consortium, Polycystic kidney disease: the complete structure of the PKD1 gene and its protein, *Cell*, 1995, 81(2):289-298

Thompson R. A. und Lachmann P. J., Reactive lysis: The complement-mediated lysis of unsensitized cells I: The characterization of the indicator factor and its identification as C7, *Journal of experimental medicine*, 1970, 151: 301-313

Timpl R., Wiedemann H., Delden V., Furthmayr H. und Kuhn K., A network model for the organization of type IV collagen molecules basement membranes, *European Journal of Biochemistry*, 1981, 120: 203-211

Torra R., Badenas C., Darnell A., Nicolau C., Volpini V., Revert L. und Estivill X., Linkage, clinical features, and prognosis of autosomal dominant polycystic kidney disease types 1 and 2, *Journal of the American Society of Nephrology*, 1996, 7(10): 2142-2151

Tory K., Lacoste T., Burglen L., Morinière V., Boddart N., Macher M. A., Llanas B., Nivet H., Bensman A., Niaudet P., Antignac C., Salomon R. und Saunier S., High NPHP1 and NPHP6 mutation rate in patients with Joubert syndrome and nephronophthisis: potential epistatic effect of NPHP6 and AHI1 mutations in patients with NPHP1 mutations, *Journal of the American Society of Nephrology*, 2007, 18(5): 1566-1575

Turner J. J., Stacey J. M., Harding B., Kotanko P., Lhotka K., Puig J. G., Roberts I., Torres R. J. und Thakker R. V., Uromodulin mutations cause familial juvenile hyperuricemic nephropathy, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2003, 88(3): 1398-1401

U

Umesono K., Murakami K. K., Thompson C. C. und Evans R. M., Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors, *Cell*, 1991, 65(7): 1255-1266

Utsch B., Sayer J. A., Attanasio M., Pereira R. R., Eccles M., Hennies H. C., Otto E. A. und Hildebrandt F., Identification of the first AHI1 gene mutations in nephronophthisis-associated Joubert syndrome, *Pediatric Nephrology*, 2006, 21(1): 32-35

V

van Limbergen H., Poppe B., Janssens A., de Bock R., de Paepe A., Noens L. und Speleman F., Molecular cytogenetic analysis of 10;11 rearrangements in acute myeloid leukemia, *Leukemia*, 2002, 16: 344-351

van Rooijen J. J., Voskamp A. F., Kamerling J. P. und Vliegenthart J. F., Glycosylation sites and site-specific glycosylation in human Tamm-Horsfall glycoprotein, *Glycobiology*, 1999, 9(1): 21-30

Varki A., Cummings R., Esko J., Freeze H., Hart G. und Marth J. (Editors), Essentials of Glycobiology, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999, 1. Druck

Verani R., Walker P. und Silva F. G., Renal cystic disease of infancy: results of histochemical studies: A report of the Southwest Pediatric Nephrology Study Group, *Pediatric Nephrology*, 1989, 3: 37-42

W

Wang S., Luo Y., Wilson P. D., Witman G. B. und Zhou J., The Autosomal Recessive Polycystic kidney disease protein is localized to primary cilia, with concentration in the basal body area, *Journal of the American Society of Nephrology*, 2004, 15: 592-602

Wang S., Zhang J., Nauli S. M., Li X., Starremans P. G., Luo Y., Roberts K. A. und Zhou J., Fibrocystin/polyductin, found in the same protein complex with polycystin-2, regulates calcium responses in kidney epithelia, *Molecular and Cellular Biology*, 2007, 27(8): 3241-3252

Ward C. J., Hogan M. C., Rossetti S., Walker D., Sneddon T., Wang X., Kubly V., Cunningham J. M., Bacallao R., Ishibashi M., Milliner D. S., Torres V. E. und Harris P. C., The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein, *Nature Genetics*, 2002, 30(3): 259-269

Ward C. J., Yuan D., Masyuk T. V., Wang X., Punyashthiti R., Whelan S., Bacallao R., Torra R., LaRusso N. F., Torres V. E. und Harris P. C., Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia, *Human Molecular Genetics*, 2003, 12(20): 2703-2710

Williams S. S., Cobo-Stark P., James L. R., Somlo S. und Igarashi P., Kidney cysts, pancreatic cysts, and biliary disease in a mouse model of autosomal recessive polycystic kidney disease, *Pediatric Nephrology*, 2008, 23(5): 733-741

Wilson P. D. und Gailav B., Cystic disease of the kidney, *Annual review of pathology: mechanisms of disease*, 2007, 2: 341-368

Wilson P. D., Geng L., Li X. und Burrow C. R., The PKD1 gene product, "polycystin-1," is a tyrosine-phosphorylated protein that colocalizes with alpha2beta1-integrin in focal clusters in adherent renal epithelia, *Laboratory Investigation*, 1999, 79(10): 1311-1323

Wilson P. D., Polycystic kidney disease, *The new England journal of medicine*, 2004: 350: 151-164

Wolf M. T., Karle S. M., Schwarz S., Anlauf M., Anlauf M., Glaeser L., Kroiss S., Burton C., Feest T., Otto E., Fuchshuber A. und Hildebrandt F., Refinement of the critical region for MCKD1 by detection of transcontinental haplotype sharing, *Kidney International*, 2003a, 64(3): 788-792

Wolf M. T., Mucha B. E., Attanasio M., Zalewski I., Karle S. M., Neumann H. P., Rahman N., Bader B., Baldamus C. A., Otto E., Witzgall R., Fuchshuber A. und Hildebrandt F., Mutations of the Uromodulin gene in MCKD type 2 patients cluster in exon 4, which encodes three EGF-like domains, *Kidney International*, 2003b, 64(5): 1580-1587

Wolf M. T., Mucha B. E., Hennies H. C., Attanasio M., Panther F., Zalewski I., Karle S. M., Otto E. A., Deltas C. C., Fuchshuber A. und Hildebrandt F., Medullary cystic kidney disease type 1: mutational analysis in 37 genes based on haplotype sharing, *Human Genetics*, 2006, 119(6): 649-658

Wolf M. T., Saunier S., O'Toole J. F., Wanner N., Groshong T., Attanasio M., Salomon R., Stallmach T., Sayer J. A., Waldherr R., Griebel M., Oh J., Neuhaus T. J., Josefiak U., Antignac C., Otto E. A. und Hildebrandt F., Mutational analysis of the RPGRIP1L gene in patients with Joubert syndrome and nephronophthisis, *Kidney International*, 2007, 72(12): 1421-1423

Woodard G. E., Li X. und Rosado J. A., Characteristics of the renal C-type natriuretic peptide receptor in hypertrophied and developing rat kidney, *Journal of Molecular Endocrinology*, 2005, (3): 519-530

Woollard J. R., Punyashtiti R., Richardson S., Masyuk T. V., Whelan S., Huang B. Q., Lager D. J., van Deursen J., Torres V. E., Gattone V. H., LaRusso N. F., Harris P. C. und Ward C. J., A mouse model of autosomal recessive polycystic kidney disease with biliary duct and proximal tubule dilatation, *Kidney International*, 2007, 72(3):328-336

Wu Y., Dai X. Q., Li Q., Chen C. X., Mai W., Hussain Z., Long W., Montalbetti N., Li G., Glynne R., Wang S., Cantiello H. F., Wu G. und Chen X. Z., Kinesin-2 mediates physical and functional interactions between polycystin-2 and fibrocystin, *Human Molecular Genetics*, 2006, 15(22): 3280-3292

Würzner R., Joysey V. C. und Lachmann P., Complement component C7: Assesment of in vivo synthesis after liver transplantation reveals that hepatocytes do not synthesize the majority of human C7, *Journal of Immunology*, 1994, 154: 4624

X

Xu G. M., Sikaneta T., Sullivan B. M., Zhang Q., Andreucci M., Stehle T., Drummond I. und Arnaout M. A., Polycystin-1 interacts with intermediate filaments, *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(49): 46544-46552

Y

Yang H., Wu C., Zhao S. und Guo J., Identification and characterization of D8C, a novel domain present in liver-specific LRP, uromodulin and glycoprotein 2, mutated in familial juvenile hyperuricaemic nephropathy, *FEBS Letters*, 2004, 578(3): 236-238

Ye Q. und Worman H. J., Protein-protein interactions between human nuclear lamins expressed in yeast, *Experimental cell research*, 1995, 219: 292-298

Yoder B. K., Richards W. G., Sweeney W. E., Wilkinson J. E., Avenier E. D. und Woychik R. P., Insertional mutagenesis and molecular analysis of a new gene associated with polycystic kidney disease, *Proceedings of the Association of American Physicians*, 1995, 107(3): 314-323

Yu S., Hackmann K., Gao J., He X., Piontek K., García-González M. A., Menezes L. F., Xu H., Germino G. G., Zuo J. und Qian F., Essential role of cleavage of Polycystin-1 at G protein-coupled receptor proteolytic site for kidney tubular structure, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2007, 104(47): 18688-18693

Z

Zatti A., Chauvet V., Rajendran V., Kimura T., Pagel P. und Caplan M. J., The C-terminal tail of the polycystin-1 protein interacts with the NaK-ATPase alpha-subunit, *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(11): 5087-5093

Zerres K., Mücher G., Becker J., Steinkamm C., Rudnik-Schöneborn S., Heikkilä P., Rapola J., Salonen R., Germino G. G., Onuchic L., Somlo S., Avner E. D., Harman L. A., Stockwin J. M. und Guay-Woodford L. M., Prenatal diagnosis of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD): molecular genetics, clinical experience, and fetal morphology, *American Journal of Medical Genetics*, 1998, 76(2): 137-144

Zerres K., Rudnik-Schöneborn S., Deget F., Holtkamp U., Brodehl J., Geisert J. und Schärer K., Autosomal recessive polycystic kidney disease in 115 children: clinical presentation, course and influence of gender. Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische, Nephrologie, *Acta Paediatrica*, 1996, 85(4): 437-445

Zerres K., Rudnik-Schöneborn S., Senderek J., Eggermann T. und Bergmann C., Autosomal recessive polycystic disease (ARPKD), *Journal of Nephrology*, 2003, 16: 453-458

Zhang M. Z., Mai W., Li C., Cho S. Y., Hao C., Moeckel G., Zhao R., Kim I., Wang J., Xiong H., Wang H., Sato Y., Wu Y., Nakanuma Y., Lilova M., Pei Y., Harris R. C., Li S., Coffey R. J., Sun L., Wu D., Chen X. Z., Breyer M. D., Zhao Z. J., McKanna J. A. und Wu G., PKHD1 protein encoded by the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease associates with basal bodies and primary cilia in renal epithelial cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2004, 101(8): 2311-2316

Zimmerhackl L. B., Rostasy K., Wiegele G., Rasenack A., Wilhelm C., Lohner M., Brandis M. und Kinne R. K., Tamm-Horsfall protein as a marker of tubular maturation, *Pediatric Nephrology*, 1996, 10(4): 448-452

VI. Anhang

A. Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Vektoren

Ausgangsvektor	PCR-Oligonukleotide		Empfangsvektor	Bezeichnung
pGEX-4T1-hc-term PKHD1	PKHD1-c-for	PKHD1-c-rev	pCRII-TOPO	TOPO-hcTerm
pCRII-OFD1	OFD1 ApaI 1 for	OFD1 AS 1012 rev	pCRII-TOPO	TOPO-OFD1 AS 1-1012
pCRII-OFD1	OFD1 AS 560 for	OFD1 AS 956 rev	pCRII-TOPO	TOPO-OFD1 AS 560-956
pCRII-OFD1	OFD1 AS 705 for	OFD1 AS 1012 rev	pCRII-TOPO	TOPO-OFD1 AS 705-1012
pCRII-OFD1	OFD1 AS 797 for	OFD1 AS 956 rev	pCRII-TOPO	TOPO-OFD1 AS 797-956
pCRII-OFD1	OFD1 AS 797 for	OFD1 AS 1012 rev	pCRII-TOPO	TOPO-OFD1 AS 797-1012
pBSR-NPR1	NPR1-AS-705-for	NPR1-AS-1010-rev	pCRII-TOPO	TOPO-NPR1 AS 705-1010
pBSR-NPR1	NPR1-AS-763-for	NPR1-AS-1061-rev	pCRII-TOPO	TOPO-NPR1 AS 763-1061
pBSR-NPR1	NPR1-AS-985-for	NPR1-AS-1010-rev	pCRII-TOPO	TOPO-NPR1 AS 985-1010
pBSR-NPR1	NPR1-AS-985-for	NPR1-AS-1061-rev	pCRII-TOPO	TOPO-NPR1 AS 985-1061
pCMV-C7	C7-AS-1-for	C7-AS-843-rev	pCRII-TOPO	TOPO-C7 AS 1-843
pCMV-C7	C7-AS-335-for	C7-AS-843-rev	pCRII-TOPO	TOPO-C7 AS 335-843
pDNR-UMOD	UMOD-AS-1-for	UMOD-AS-640-rev	pCRII-TOPO	TOPO-UMOD AS 1-640
pDNR-UMOD	UMOD-AS-158-for	UMOD-AS-444-rev	pCRII-TOPO	TOPO-UMOD AS 158-444
pDNR-UMOD	UMOD-AS-298-for	UMOD-AS-557-rev	pCRII-TOPO	TOPO-UMOD AS 298-557
pDNR-UMOD	UMOD-AS-419-for	UMOD-AS-444-rev	pCRII-TOPO	TOPO-UMOD AS 419-444
pDNR-UMOD	UMOD-AS-419-for	UMOD-AS-640-rev	pCRII-TOPO	TOPO-UMOD AS 419-640

Ausgangsvektor	Restriktionsstellen	Oligonukleotide		Bezeichnung
pCMX	<i>KpnI/BamHI</i>	cMyc-EcoRI-XhoI-BamHI for	cMyc-EcoRI-XhoI-BamHI rev	pCMX-Myc
pCMX-Myc	<i>EcoRI/XhoI</i>	MycPac for	MycPac rev	pCMX-Myc- <i>PacI</i>
pACT2	<i>EcoRI/XhoI</i>	EcoRI-PacI-XhoI for	EcoRI-PacI-XhoI rev	pACT2- <i>PacI</i>
pACT2- <i>PacI</i>	<i>EcoRI/PacI</i>	EcoRI-ApaI-PacI for	EcoRI-ApaI-PacI rev	pACT2- <i>ApaI</i>
pACT2	<i>EcoRI/PacI</i>	EcoRI-PacI-XhoI if for	EcoRI-PacI-XhoI if rev	pACT2- <i>PacI</i> if

Ausgangsvektor	5'-Restriktionsstelle	3'-Restriktionsstelle	Empfangsvektor	Bezeichnung
TOPO-hcTerm	<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>	pGBK-T7	pGBK-hcTerm
TOPO-OFD1 AS 1-1012	<i>ApaI</i>	<i>PacI</i>	pACT2	pACT-OFD1 AS 1-1012
TOPO-OFD1 AS 560-956	<i>EcoRI</i>	<i>PacI</i>	pACT2	pACT-OFD1 AS 560-956
TOPO-OFD1 AS 560-956	<i>EcoRI</i>	<i>PacI</i>	pACT2	pACT-OFD1 AS 705-1012
TOPO-OFD1 AS 797-1012	<i>EcoRI</i>	<i>PacI</i>	pACT2	pACT-OFD1 AS 797-956
TOPO-OFD1 AS 797-1012	<i>EcoRI</i>	<i>PacI</i>	pACT2	pACT-OFD1 AS 797-1012
TOPO-NPR1 AS 705-1010	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>	pACT2	pACT-NPR1 AS 705-1010
TOPO-NPR1 AS 763-1061	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>	pACT2	pACT-NPR1 AS 763-1061
TOPO-NPR1 AS 985-1010	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>	pACT2	pACT-NPR1 AS 985-1010
TOPO-NPR1 AS 985-1061	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>	pACT2	pACT-NPR1 AS 985-1061
TOPO-C7 AS 1-843	<i>PacI</i>	<i>XhoI</i>	pACT2	pACT-C7 AS 1-843
TOPO-C7 AS 335-843	<i>PacI</i>	<i>XhoI</i>	pACT2	pACT-C7 AS 335-843
TOPO-UMOD AS 1-640	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>	pACT2	pACT-UMOD AS 1-640
TOPO-UMOD AS 158-444	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>	pACT2	pACT-UMOD AS 158-444
TOPO-UMOD AS 298-557	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>	pACT2	pACT-UMOD AS 298-557
TOPO-UMOD AS 419-444	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>	pACT2	pACT-UMOD AS 419-444
TOPO-UMOD AS 419-640	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>	pACT2	pACT-UMOD AS 419-640
pGBK-hcTerm	<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>	pCMX-Flag	pCMX-Flag-hcTerm
pACT-C7 AS 645-843 (Klon 11-23)	<i>PacI</i>	<i>XhoI</i>	pCMX-Myc	pCMX-Myc C7 AS 645-843
TOPO-UMOD AS 1-640	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>	pCMX-Myc	pCMX-Myc-UMOD AS 1-640
TOPO-UMOD AS 158-444	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>	pCMX-Myc	pCMX-Myc-UMOD AS 158-444
TOPO-UMOD AS 298-557	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>	pCMX-Myc	pCMX-Myc-UMOD AS 298-557
TOPO-UMOD AS 419-444	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>	pCMX-Myc	pCMX-Myc-UMOD AS 419-444
TOPO-UMOD AS 419-640	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>	pCMX-Myc	pCMX-Myc-UMOD AS 419-640
TOPO-UMOD AS 1-640	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>	pGEX-4T2	pGEX-UMOD AS 1-640
TOPO-UMOD AS 158-444	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>	pGEX-4T2	pGEX-UMOD AS 158-444
TOPO-UMOD AS 298-557	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>	pGEX-4T2	pGEX-UMOD AS 298-557
TOPO-UMOD AS 419-444	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>	pGEX-4T2	pGEX-UMOD AS 419-444
TOPO-UMOD AS 419-640	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>	pGEX-4T2	pGEX-UMOD AS 419-640

B. Vektorkarten der hergestellten Vektoren

Dargestellt sind die Vektorkarten der in dieser Arbeit hergestellten Vektoren. Die TOPO-Vektoren sind nicht dargestellt, da diese lediglich der Umklonierung dienen und nicht für weiterführende Experimenten verwendet wurden. Vektoren, in die mittels eines Oligos weitere Restriktionsschnittstellen eingeführt wurden, sind ebenfalls nicht aufgenommen.

Dargestellt in den Vektorkarten sind die eventuell vorhandenen Resistenzgene; Ampicillin- (amp^{res}) und Kanamycin-Resistenz (Kan^{res}), welche durch dunkelblaue Pfeile dargestellt werden, sowie die Leucin- (Leu) und Tryptophangene (Trp), ebenfalls von blaue Pfeile dargestellt. Als offenes, rotes Kästchen sind die Replikationsursprünge (Ori) dargestellt. Flag- und Myc-Epitope werden ebenfalls als offene, rote Kästchen dargestellt.

Die Promotoren sind als hellblaues Kästchen dargestellt. Die cDNS, welche für die Fusionsproteine kodiert, wird als dunkelblaue Pfeile dargestellt. Weiterhin sind verschiedene Restriktionsstellen dargestellt. Die Zahlen entsprechen den Nucleotiden bei denen die jeweiligen Restriktionsenzyme in der Sequenz schneiden.

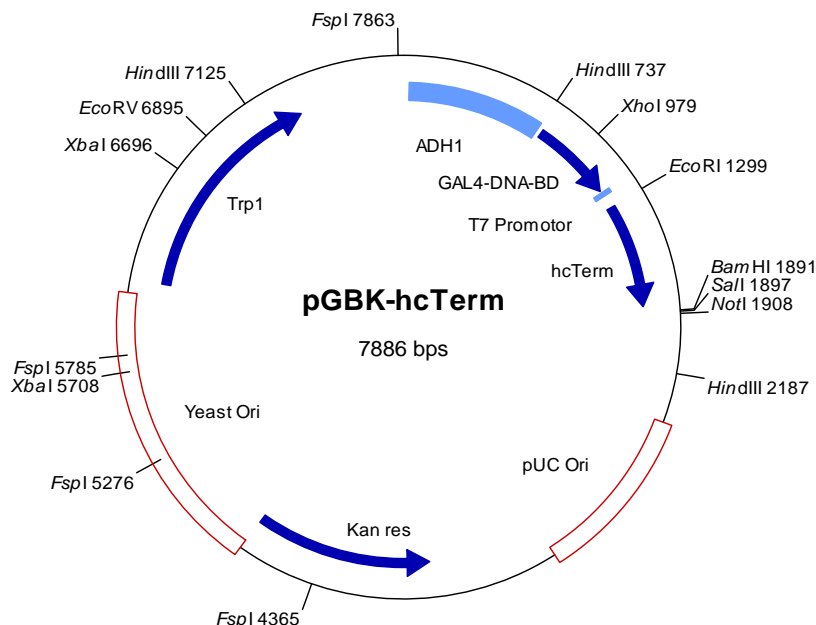


Abb. B.1: Vektorkarte von pGBK-hcTerm

Dieses Expressionsplasmid enthält die cDNS für ein Fusionsprotein aus den Aminosäuren 1-147 des GAL4 Transkriptionsfaktors (DNS-Bindungsdomäne) (GAL4-DNA-BD) und den Aminosäuren 3881 bis 4074 des humanen Polyduktin (hcTerm) unter Kontrolle des ADH1-Promotors.

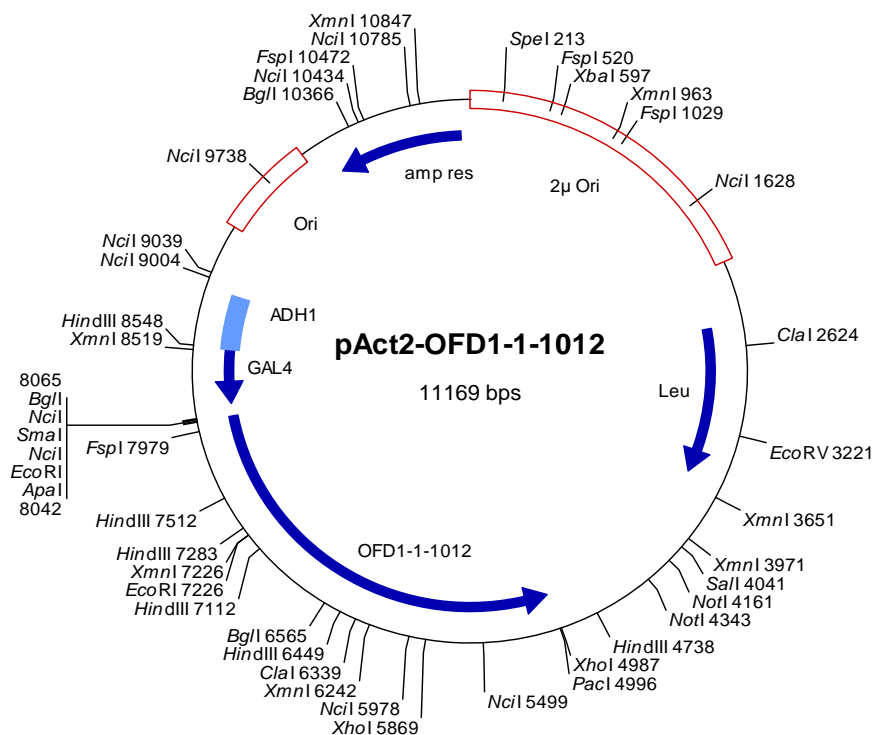


Abb. B.2: Vektorkarte von pAct2-OFD1 AS 1-1012

Expressionsplasmid, welches die cDNS für ein Fusionsprotein aus den AS 768-881 des GAL4-Transkriptionsfaktors (Aktivierungsdomäne) (GAL4) und den Aminosäuren 1 bis 1012 von OFD1 (OFD1-1-1012) enthält. Die cDNS wird unter der Kontrolle des ADH1-Promotors synthetisiert.

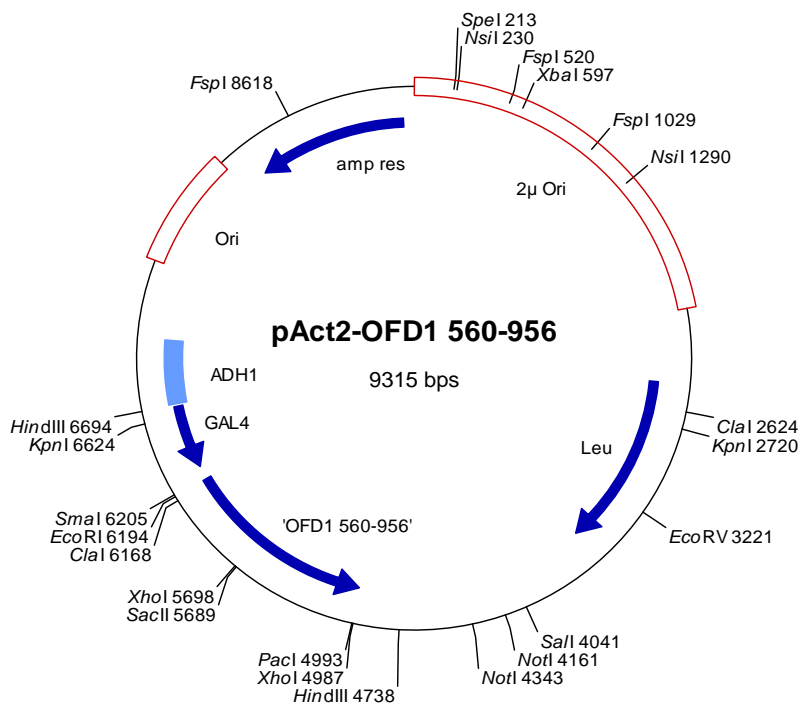


Abb. B.3: Vektorkarte von pAct2-OFD1 AS 560-956

Expressionsplasmid, welches die cDNS für ein Fusionsprotein aus der GAL4-Aktivierungsdomäne (GAL4) und den Aminosäuren 560 bis 956 von OFD1 (OFD1 560-956) enthält. Die cDNS wird unter der Kontrolle des ADH1-Promotors synthetisiert.

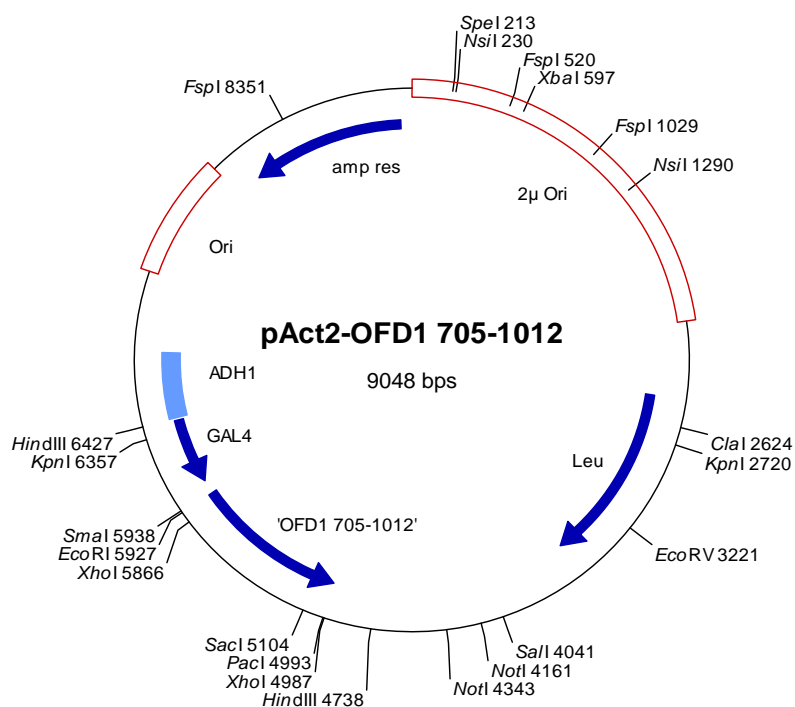


Abb. B.4: Vektorkarte von pACT2-OFD1 AS 705-1012

Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus der Aktivierungsdomäne von GAL4 (GAL4) und den Aminosäuren 705 bis 1012 von OFD1 (OFD1 705-1012), unter Kontrolle des ADH1-Promotors.

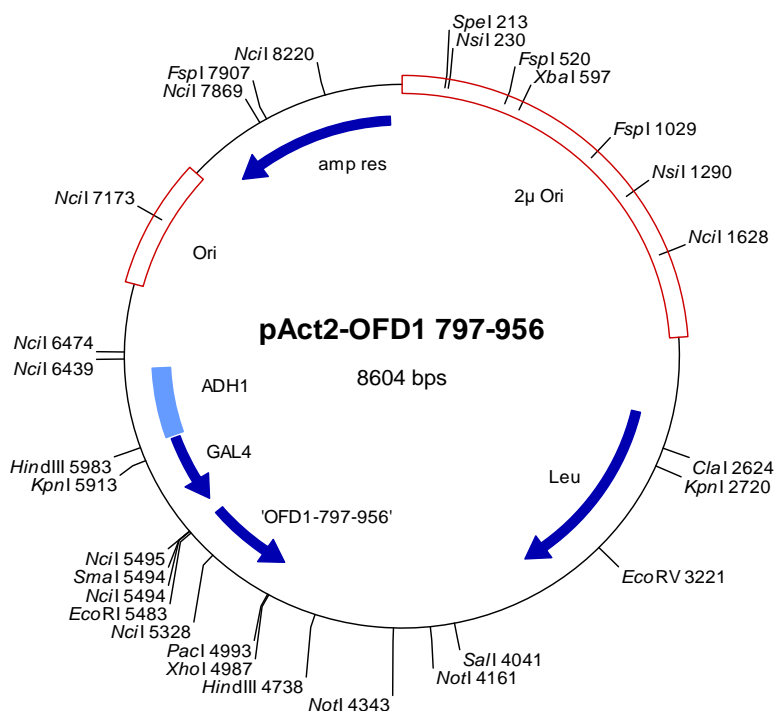


Abb. B.5: Vektorkarte von pACT2-OFD1 AS 797-956

pACT2-OFD1 AS 797-956 enthält die cDNS für ein Fusionsprotein aus der Aktivierungsdomäne von GAL4 (GAL4) und den Aminosäuren 797 bis 956 von OFD1 (OFD1-797-956), unter Kontrolle des ADH1-Promotors.

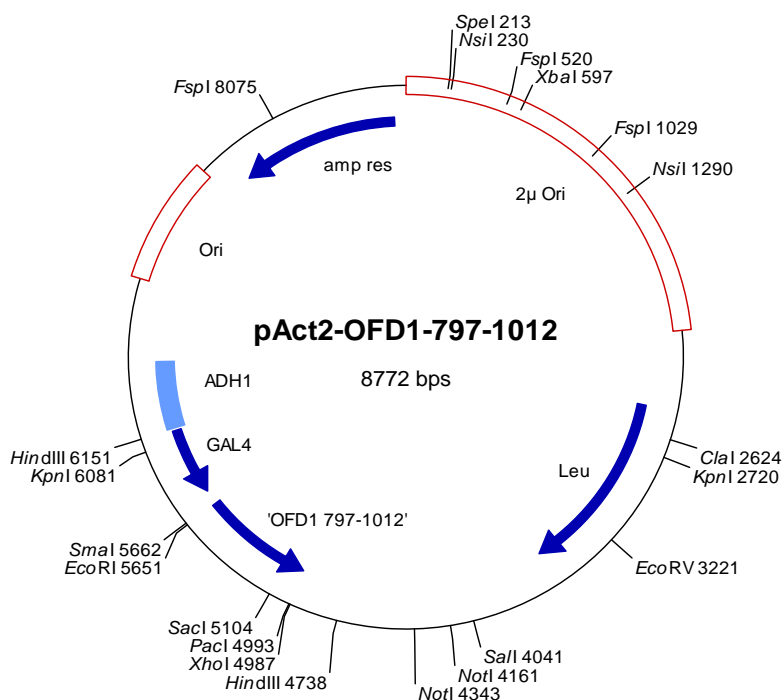


Abb. B.6: Vektorkarte von pACT2-OFD1 AS 797-1012

Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus der Aktivierungsdomäne von GAL4 (GAL4) und den Aminosäuren 797 bis 1012 von OFD1 (OFD1 797-1012), unter Kontrolle des ADH1-Promotors.

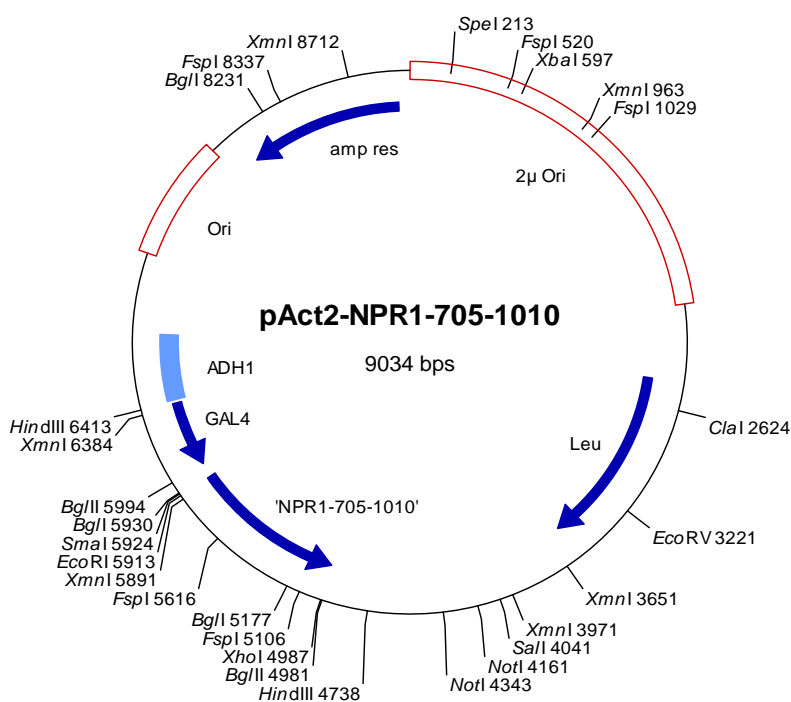


Abb. B.7: Vektorkarte von pACT2-NPR1 AS 705-1010

Dieses Plasmid enthält eine cDNS, welche für ein Fusionsprotein aus der Aktivierungsdomäne von GAL4 (GAL4) und den Aminosäuren 705 bis 1010 von NPR1 (NPR1-705-1010) kodiert unter Kontrolle des ADH1-Promotors.

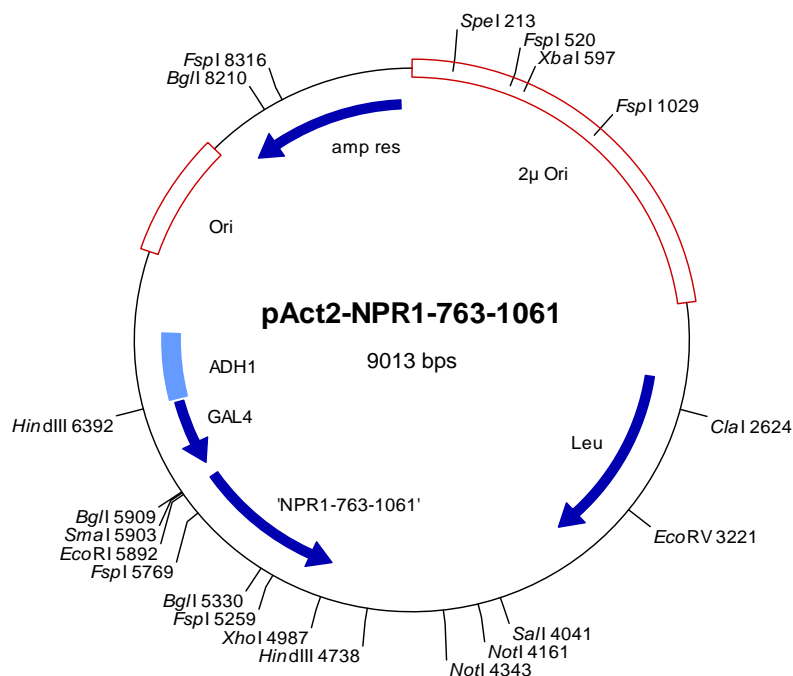


Abb. B.8: Vektorkarte von pACT2-NPR1 AS 763-1061

Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus der Aktivierungsdomäne von GAL4 (GAL4) und den Aminosäuren 763 bis 1061 von NPR1 (NPR1-763-1061), unter Kontrolle des ADH1-Promotors.

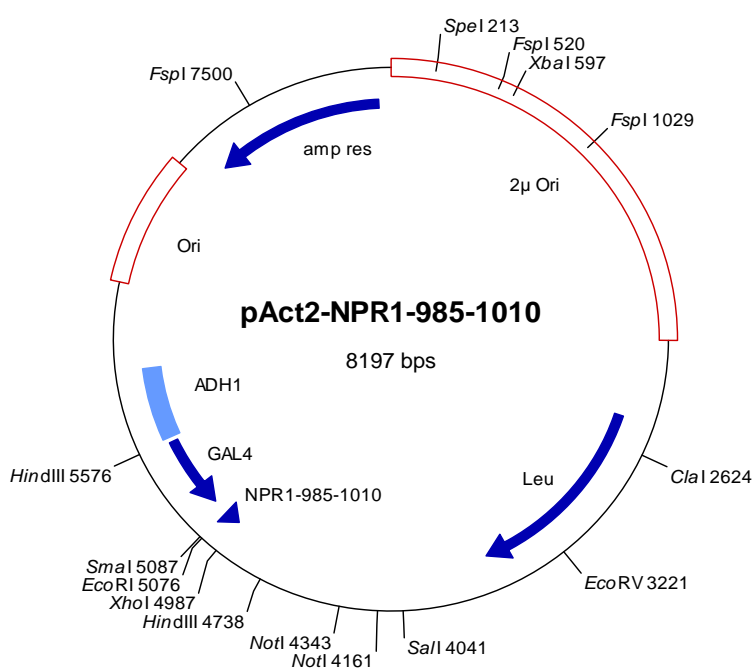


Abb. B.9: Vektorkarte von pACT2-NPR1 AS 985-1010

pACT2-NPR1 AS 985-1010 enthält die cDNS für ein Fusionsprotein aus der Aktivierungsdomäne von GAL4 (GAL4) und den Aminosäuren 985 bis 1010 von NPR1 (NPR1-985-1010), unter Kontrolle des ADH1-Promotors.

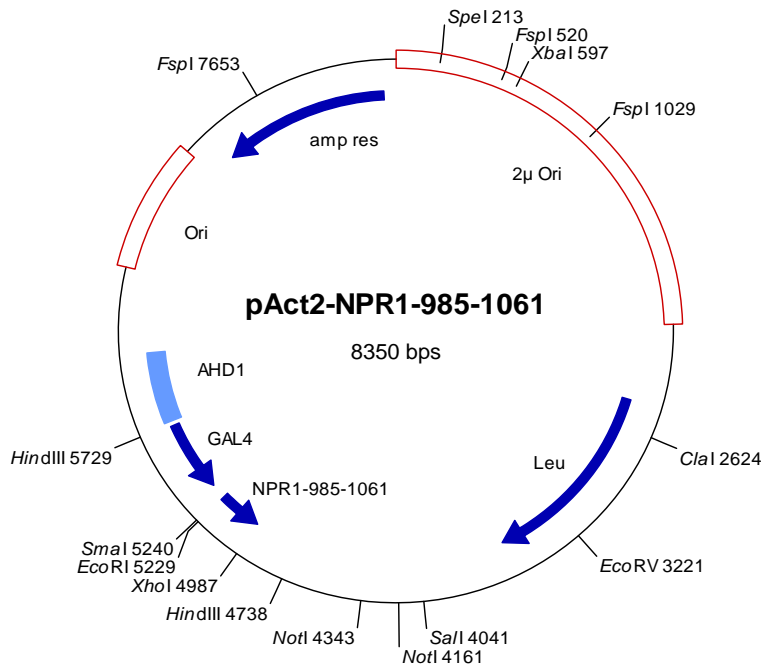


Abb. B.10: Vektorkarte von pACT2-NPR1 AS 985-1061

Dieses Expressionsplasmid enthält die cDNS für ein Fusionsprotein aus der Aktivierungsdomäne von GAL4 (GAL4) und den Aminosäuren 985 bis 1061 von NPR1 (NPR1-985-1061) unter Kontrolle des ADH1-Promotors.

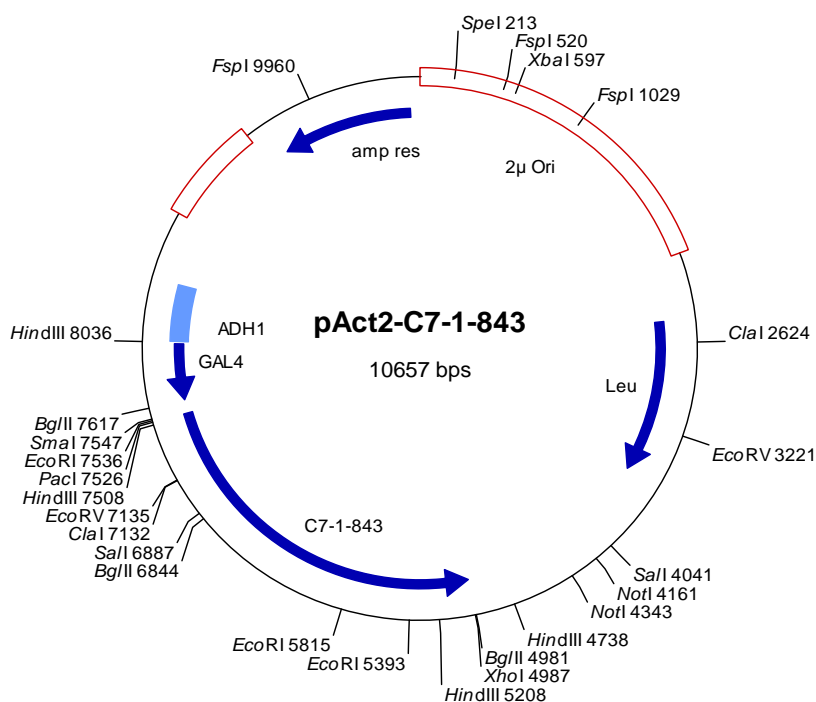


Abb. B.11: Vektorkarte von pACT2-C7 AS 1-843

Damit ein Fusionsprotein aus der Aktivierungsdomäne von GAL4 (GAL4) und den Aminosäuren 1 bis 843 von C7 (C7-1-843) exprimiert werden kann, wurde die dafür kodierende cDNS in ein Expressionsplasmid unter Kontrolle des ADH1-Promotors kloniert.

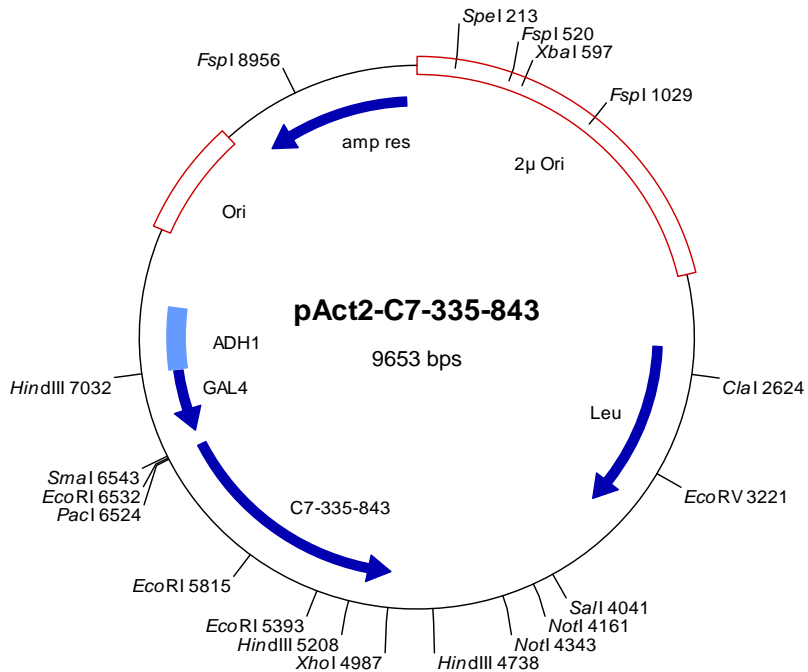


Abb. B.12: Vektorkarte von pACT2-C7 AS 335-843

Ein Fusionsprotein aus der Aktivierungsdomäne von GAL4 (GAL4) und den Aminosäuren 335 bis 843 von C7 (C7-335-843) kann unter Kontrolle des ADH1-Promotors exprimiert werden.

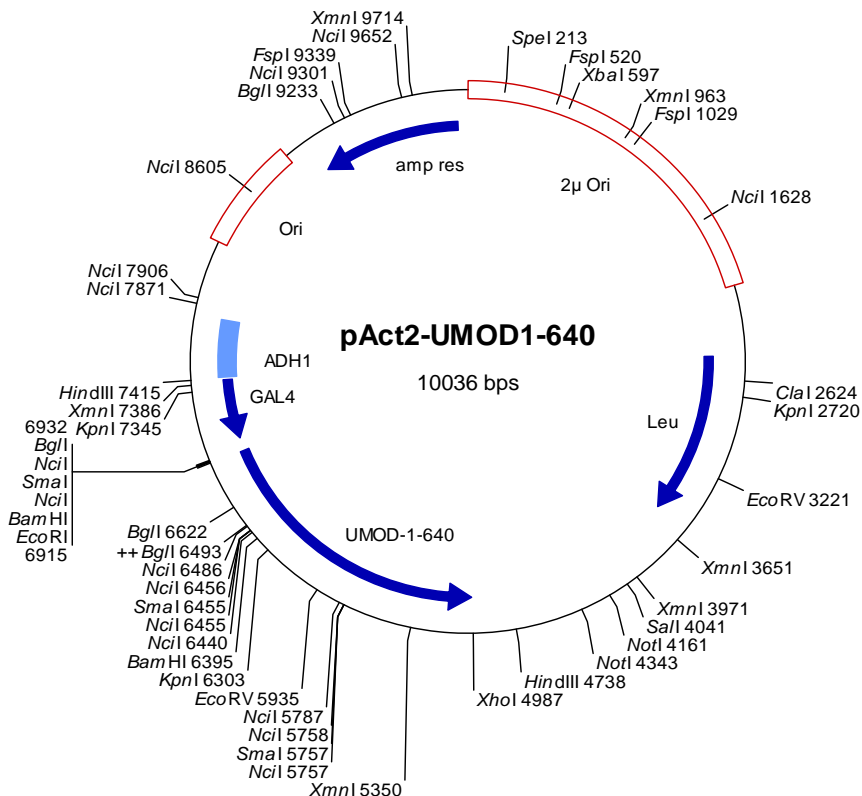


Abb. B.13: Vektorkarte von pACT2-UMOD AS 1-640

Dieses Expressionsplasmid enthält die cDNS für ein Fusionsprotein aus der Aktivierungsdomäne von GAL4 (GAL4) und den Aminosäuren 1 bis 640 von UMOD (UMOD-1-640), unter Kontrolle des ADH1-Promotors.

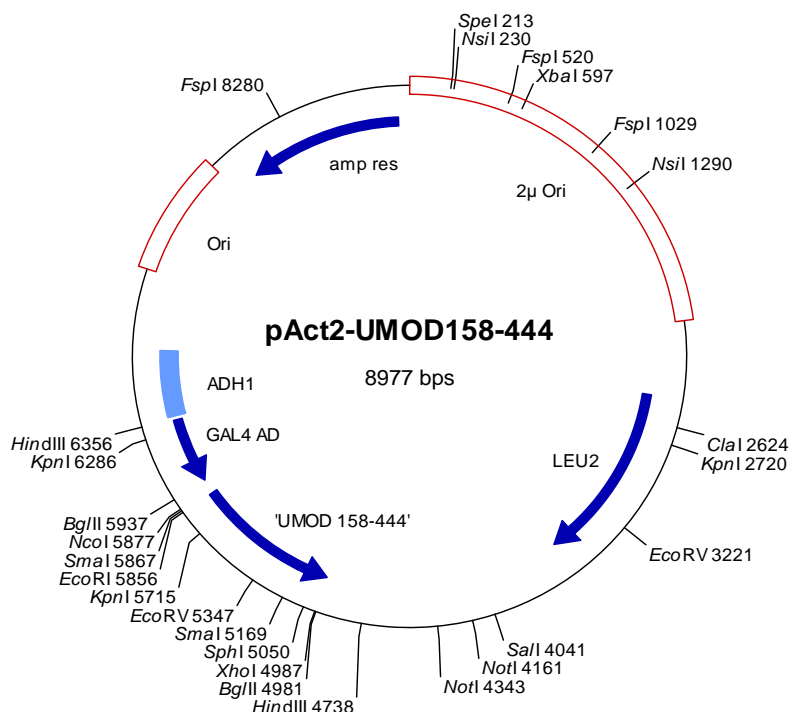


Abb. B.14: Vektorkarte von pACT2-UMOD AS 158-444

Dieses Expressionsplasmid erlaubt die Expression eines Fusionsprotein aus der Aktivierungsdomäne von GAL4 (GAL4) und den Aminosäuren 158 bis 444 von UMOD (UMOD-158-444), welches von dem ADH1-Promotor kontrolliert wird.

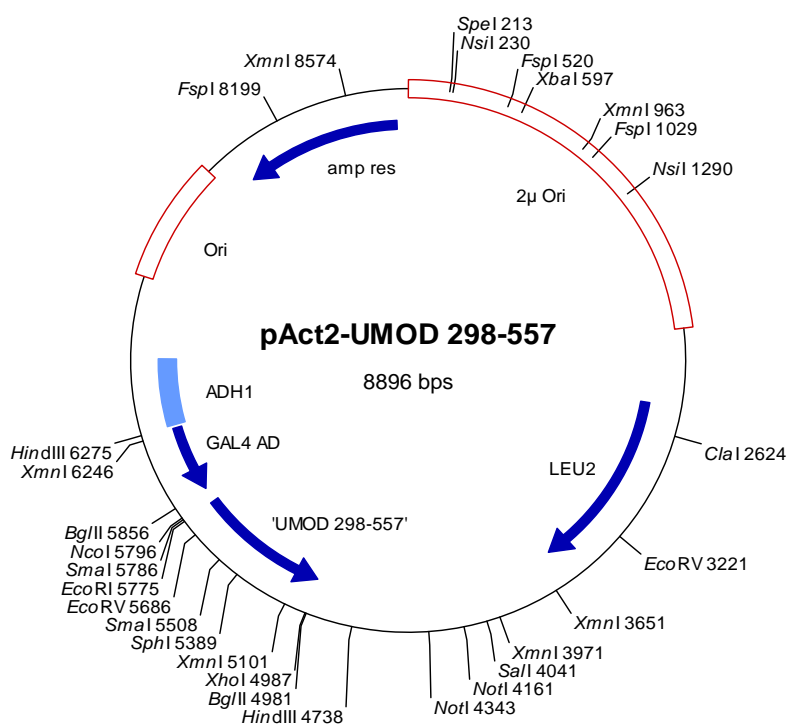


Abb. B.15: Vektorkarte von pACT2-UMOD AS 298-557

Dieses Expressionsplasmid enthält die cDNS für ein Fusionsprotein aus der Aktivierungsdomäne von GAL4 (GAL4) und den Aminosäuren 298 bis 557 von UMOD (UMOD 298-557), unter Kontrolle des ADH1-Promotors.

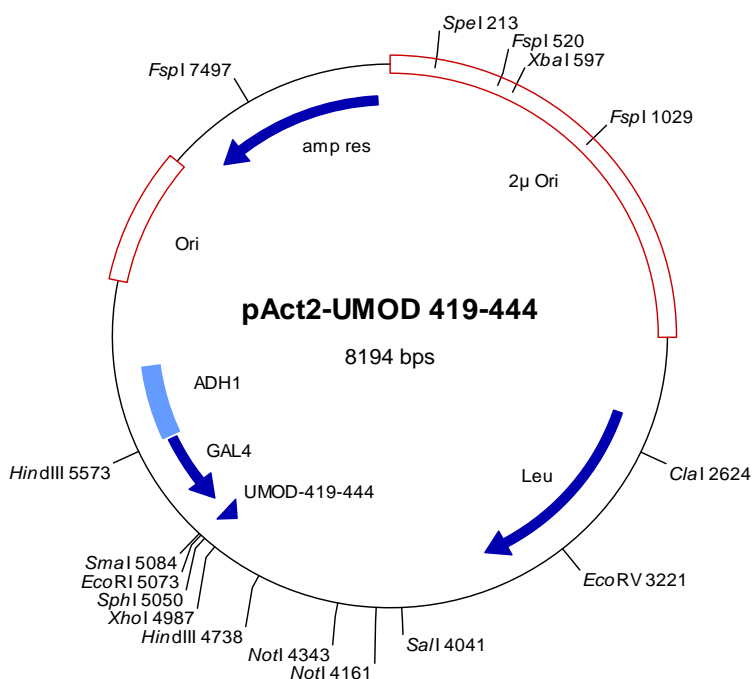


Abb. B.16: Vektorkarte von pACT2-UMOD AS 419-444

Ein Fusionsprotein aus der Aktivierungsdomäne von GAL4 (GAL4) und den Aminosäuren 419 bis 444 von UMOD (UMOD-419-444) kann unter Kontrolle des ADH1-Promotors exprimiert werden.

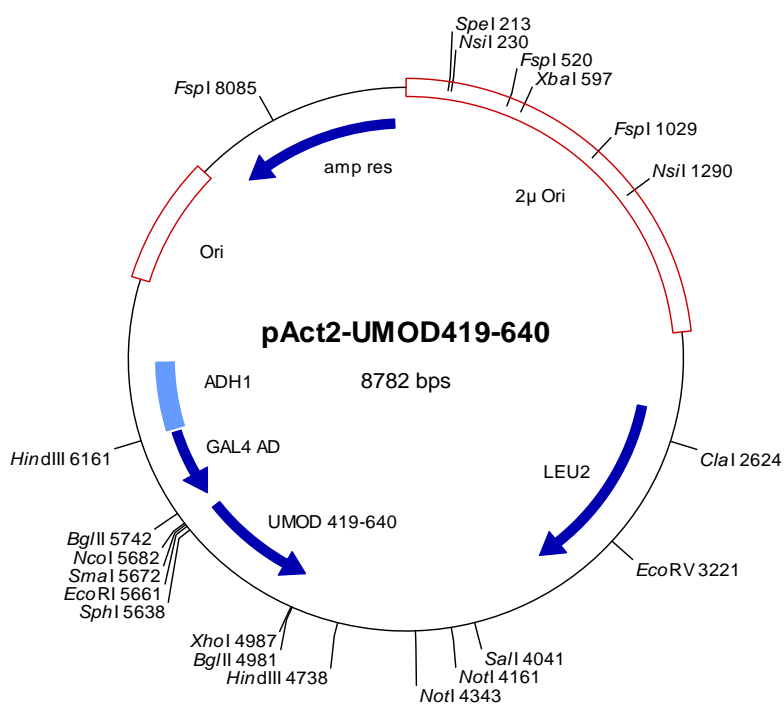


Abb. B.17: Vektorkarte von pACT2-UMOD AS 419-640

pACT2-UMOD AS 419-640 enthält die cDNS für das Fusionsprotein aus der Aktivierungsdomäne von GAL4 (GAL4) und den Aminosäuren 419 bis 640 von UMOD (UMOD 419-640) unter Kontrolle des ADH1-Promotors.

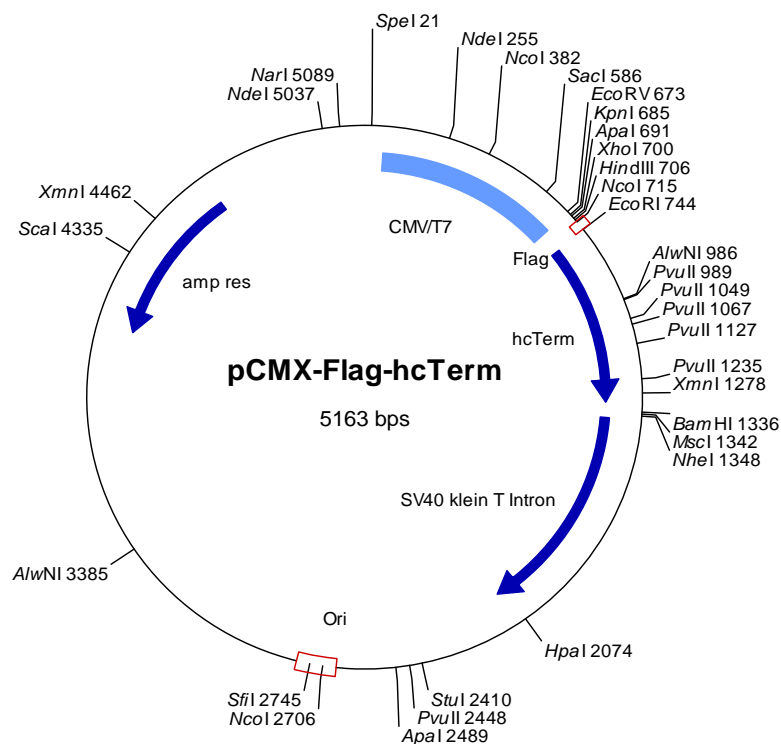


Abb. B.18: Vektorkarte von pCMX-Flag-hcTerm

Dieses eukaryontisches Expressionsplasmid enthält die cDNS für die Aminosäuren 3881 bis 4074 von Polyduktin (hcTerm), welches mit einem Startcodon und einem Flag-Epitop (Flag) versehen ist, unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

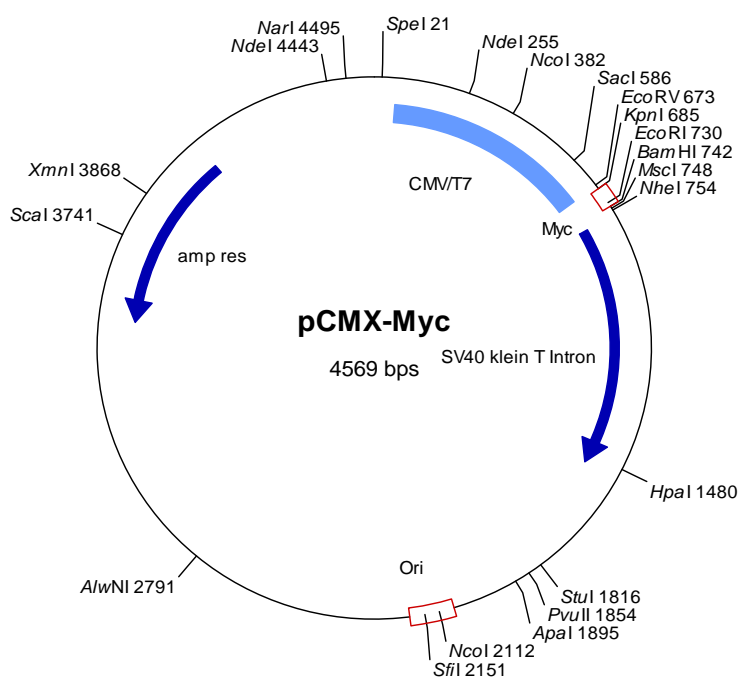


Abb. B.19: Vektorkarte von pCMX-Myc

Dieses eukaryontisches Expressionsplasmid, unter der Kontrolle des CMV-Promotors, enthält ein Myc-Epitop (Myc).

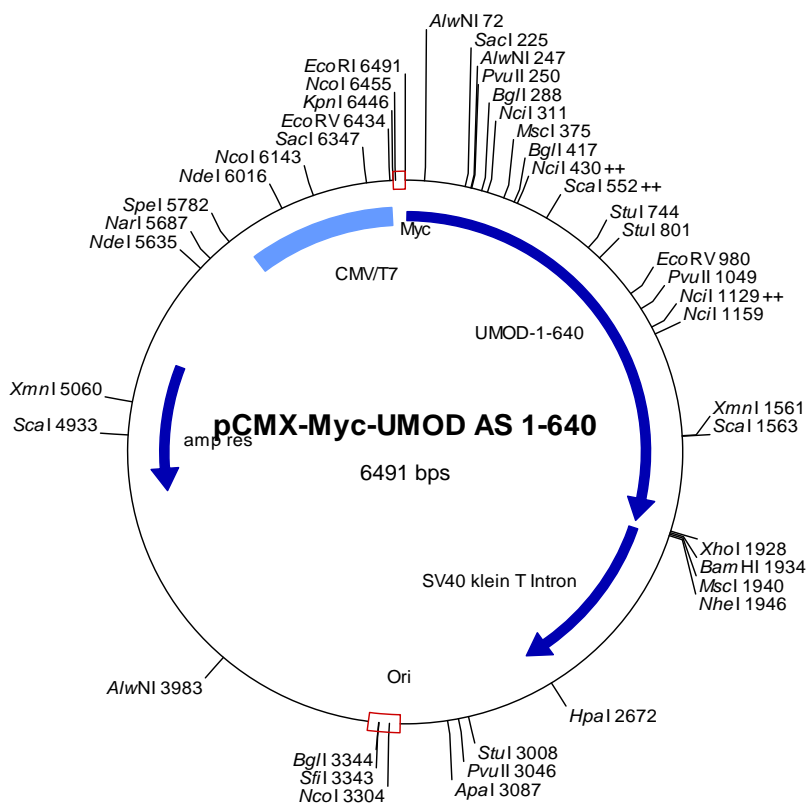


Abb. B.20: Vektorkarte von pCMX-Myc-UMOD AS 1-640

Dieses Plasmid führt zur Expression von einem Fusionsprotein aus den Aminosäure 1 bis 640 von Uromodulin (UMOD 1-640) und einem Myc-Epitop. Die cDNS steht unter Kontrolle des CMV-Promotors.

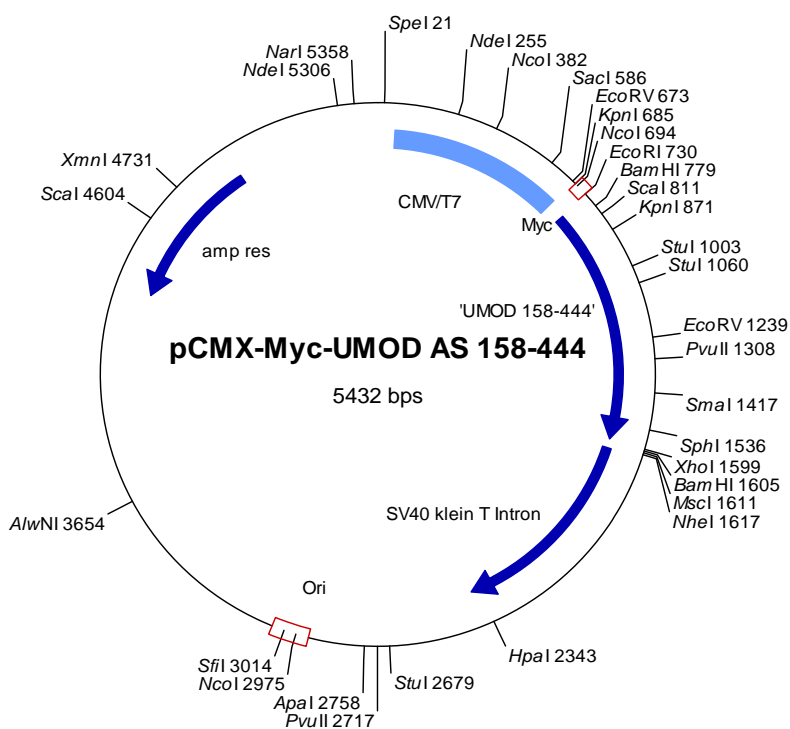


Abb. B.21: Vektorkarte von pCMX-Myc-UMOD AS 158-444

Eukaryontisches Expressionsplasmid welches ein Startcodon und die cDNS für die Aminosäuren 158 bis 444 von Uromodulin (UMOD 158-444) und ein Myc-Epitop enthält. Die Expression steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

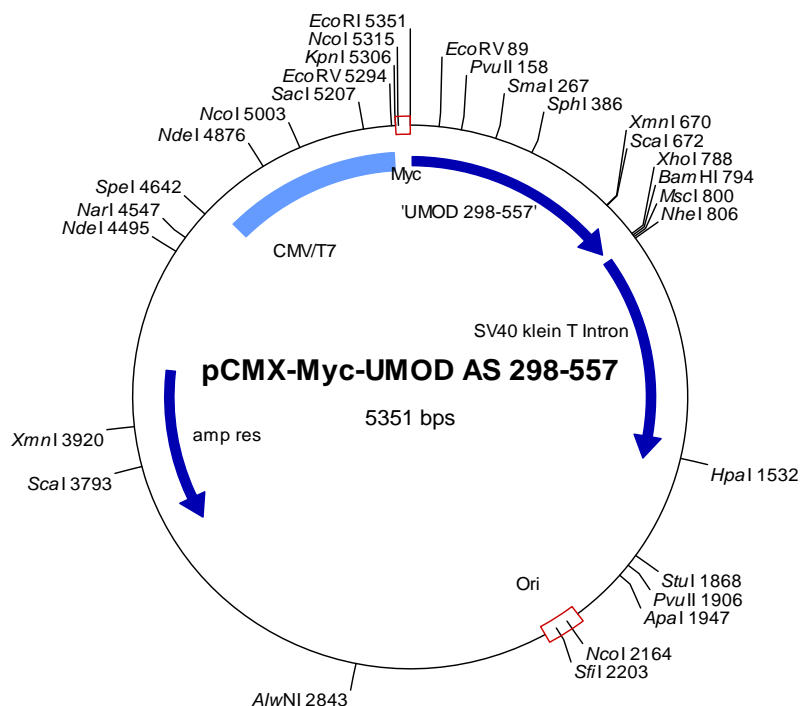


Abb. B.22: Vektorkarte von pCMX-Myc-UMOD AS 298-557

Dieses Plasmid ermöglicht die Expression eines Myc-Epitop-markierten Uromodulin Aminosäuren 298 bis 557 (UMOD 298-557) unter Kontrolle des CMV-Promotors.

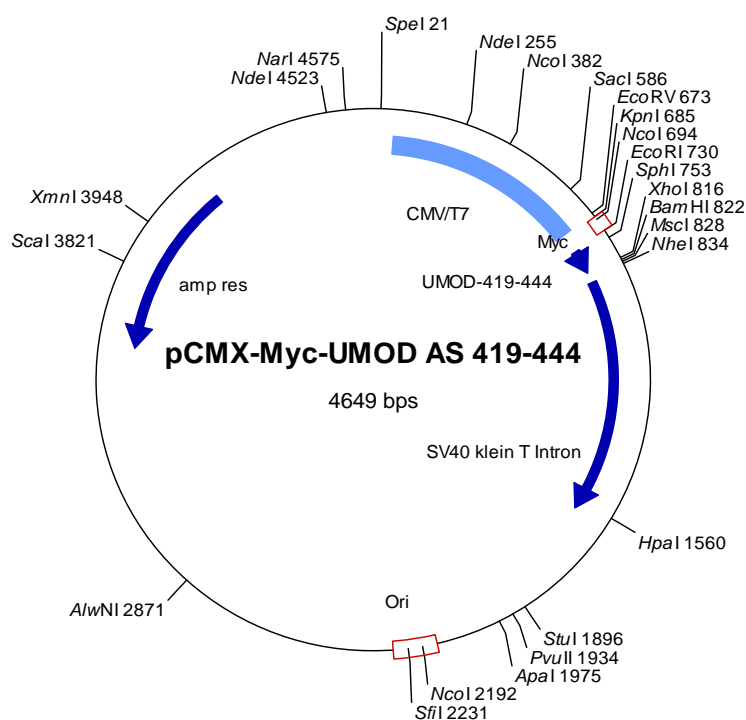


Abb. B.23: Vektorkarte von pCMX-Myc-UMOD AS 419-444

Der CMV-Promotor kontrolliert die Expression eines Myc-Epitop markierten Uromodulin Aminosäuren 419 bis 444 (UMOD-419-444).

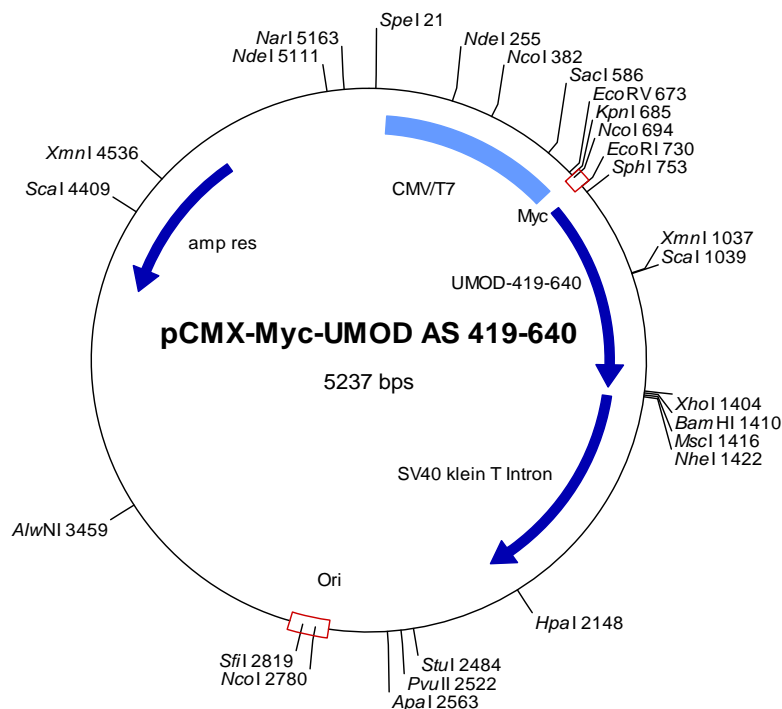


Abb. B.24: Vektorkarte von pCMX-Myc-UMOD AS 419-640

Das Plasmid enthält die cDNS für ein Myc-Epitop-markiertes Uromodulin Aminosäure 419 bis 640 (UMOD-419-640). Die Expression steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

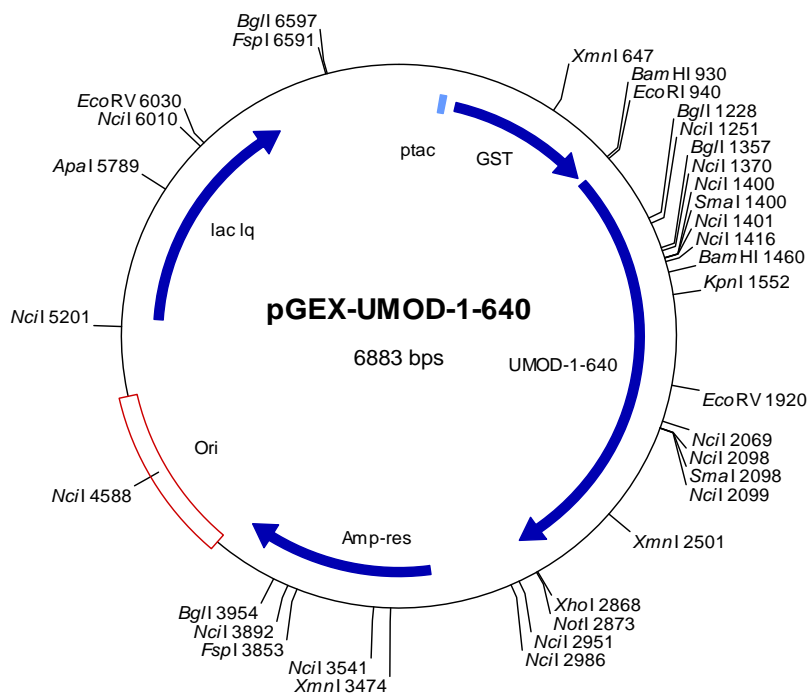


Abb. B.25: Vektorkarte von pGEX-UMOD AS 1-640

Prokaryotisches Expressionsplasmid, welches die cDNS für ein Fusionsprotein aus GST und den Aminosäuren 1 bis 640 von Uromodulin (UMOD-1-640) kodiert. Die Expression steht unter der Kontrolle des tac-Promotors.

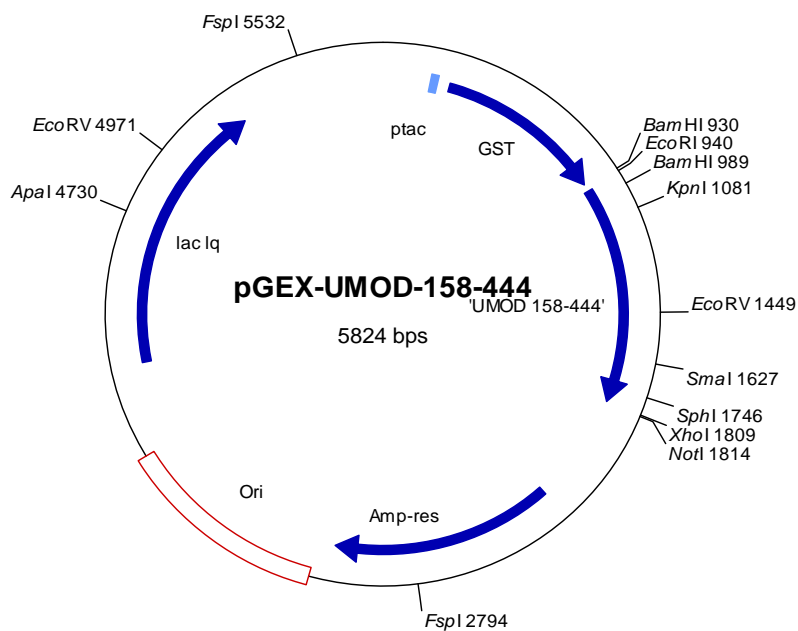


Abb. B.26: Vektorkarte von pGEX-UMOD AS 158-444

Das Plasmid enthält die cDNS, welches für ein Fusionsprotein aus GST und den Aminosäuren 158 bis 444 von Uromodulin (UMOD-158-444) kodiert. Die Expression steht unter der Kontrolle des tac-Promotors.

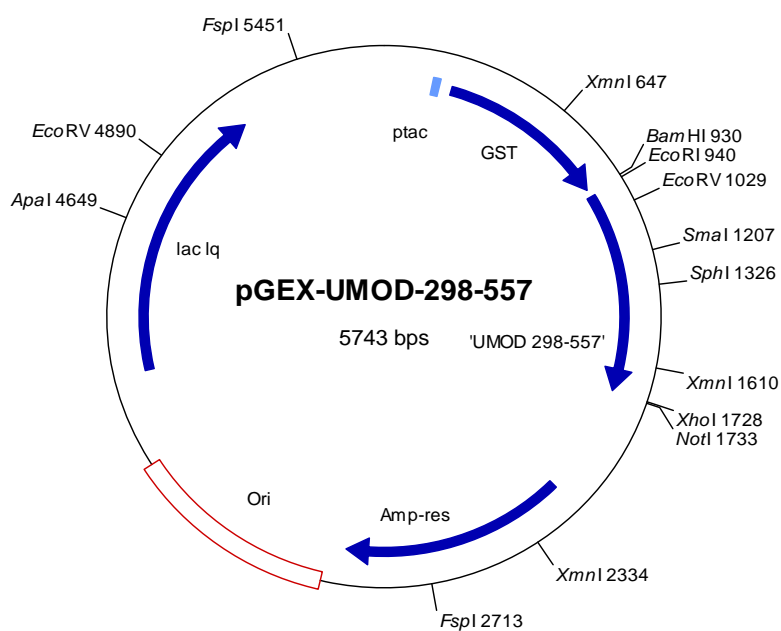


Abb. B.27: Vektorkarte von pGEX-UMOD AS 298-557

Das Plasmid ermöglicht die Expression eines Fusionsproteins aus GST und den Aminosäuren 298 bis 557 von Uromodulin (UMOD-298-557) unter der Kontrolle des tac-Promotors.

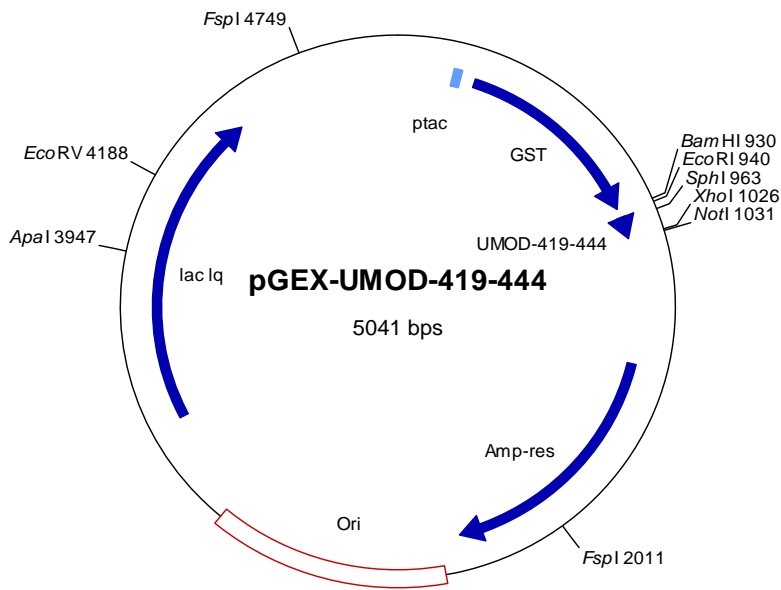


Abb. B.28: Vektorkarte von pGEX-UMOD AS 419-444

Prokaryotisches Expressionsplasmid, welches die cDNS für ein Fusionsprotein aus GST und den Aminosäuren 419 bis 444 von Uromodulin (UMOD-419-444) kodiert. Die Expression steht unter der Kontrolle des *tac*-Promotors.

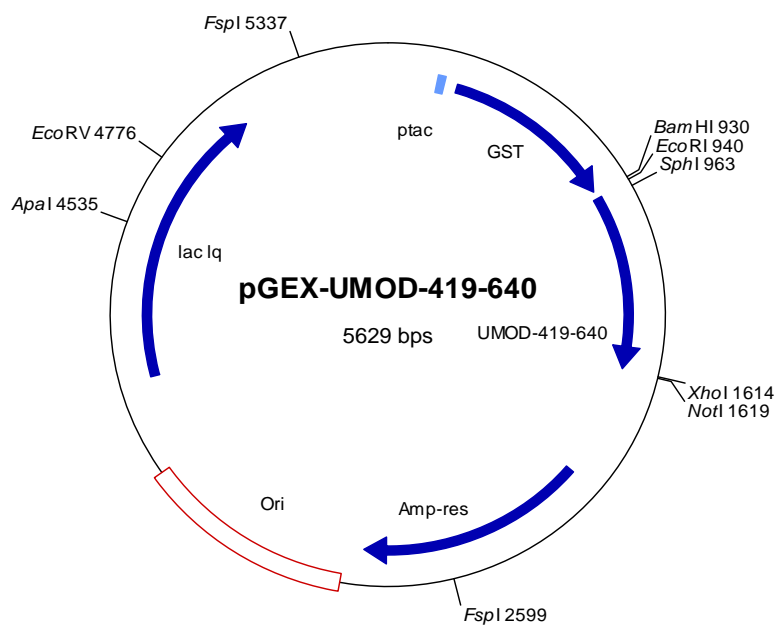


Abb. B.29: Vektorkarte von pGEX-UMOD AS 419-640

Das Plasmid enthält die cDNS für ein Fusionsprotein aus GST und den Aminosäuren 419 bis 640 von Uromodulin (UMOD-419-640). Die Expression steht unter der Kontrolle des *tac*-Promotors.

C. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon 6-19 mit der gDNS-Sequenz von UMOD aus der Ensembl-Datenbank

	4151				4200
	Ex6				
Klon 6-19 cDNS	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
gDNS UMOD Ensembl	AAACCCATGC	CACTTACAGC	AACACCCTCT	ACCTGGCAGA	TGAGATCATC
	4201				4250
Klon 6-19 cDNS	~~~~~	~~~~~ATCAA	AATCAACTTT	GCATGCTCCT	ACCCCTGGA
gDNS UMOD Ensembl	ATCCGTGACC	TCAACATCAA	AATCAACTTT	GCATGCTCCT	ACCCCTGGA
	4251				4300
Klon 6-19 cDNS	CATGAAAGTC	AGCCTGAAGA	CCGCCCTACA	GCCAATGGTC	AGGTGTGGCC
gDNS UMOD Ensembl	CATGAAAGTC	AGCCTGAAGA	CCGCCCTACA	GCCAATGGTC	AGGTGTGGCC
	4301				4350
Klon 6-19 cDNS	AGAGAGGGTC	CCTAGGGCCC	CTAGATGGTT	CTAA [■] CCCCAA	ACCCCTTAAC
gDNS UMOD Ensembl	AGAGAGGGTC	CCTAGGGCCC	CTAGATGGTT	CTAACCCCAA	ACCCCTTAAC
	4351				4400
Klon 6-19 cDNS	CATGAGCTTC	CCTGTCAACT	GCCACCCACA	GGGAGCTGGG	AGTGAGGGCT
gDNS UMOD Ensembl	CATGAGCTTC	CCTGTCAACT	GCCACCCACA	GGGAGCTGGG	AGTGAGGGCT
	4401				4450
Klon 6-19 cDNS	GGAATCAGG	GTTGCCCAAT	GGAAGAGCCA	GGAATTCTGG	AGCCAGGTT
gDNS UMOD Ensembl	GGAATCAGG	GTTGCCCAAT	GGAAGAGCCA	GGAATTCTGG	AGCCAGGTT
	4451				4500
Klon 6-19 cDNS	CAAATCTAGA	CTTTGTCATA	AATGATGGTT	ATGCCCTGGC	CAGTGGGGGA
gDNS UMOD Ensembl	CAAATCTAGA	CTTTGTCATA	AATGATGGTT	ATGCCCTGGC	CAGTGGGGGA
	4501				4550
Klon 6-19 cDNS	CA~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
gDNS UMOD Ensembl	CAGAGTCAAA	GCACTGCCTG	GTTCAAGCCC	CAGCTCTGTC	ACTTACTAGT



Stopcodon






Ende Exon

Kursiv


Intron Sequenz


D. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon 8-28 mit der mRNA-Sequenz von MLLT10 aus der Ensembl-Datenbank

		1001			1050
					Ex8  Ex9
Klon 8-28 cDNS	~~~~~	~~~~~	~GTCGACGCG	GCCGCGAAAG	AGAAAAAAAA
mRNS MLLT10 Ensembl	GATTCTTCCTC	TCACTCTCAG	GATAAACAT	CATGAGAAAG	AGAAAAAAAA
		1051			1100
Klon 8-28 cDNS	ATATAAAGAG	AAGGACAAAC	ACAAACAGAA	ACACAAGAAG	CAGCCAGAAC
mRNS MLLT10 Ensembl	ATATAAAGAG	AAGGACAAAC	ACAAACAGAA	ACACAAGAAG	CAGCCAGAAC
		1101			1150
					 Ex10
Klon 8-28 cDNS	CATCACCTGC	ATTGGTTCCA	TCCTTGACTG	TTACTACAGA	AAAAACTTAT
mRNS MLLT10 Ensembl	CATCACCTGC	ATTGGTTCCA	TCCTTGACTG	TTACTACAGA	AAAAACTTAT
		1151			1200
Klon 8-28 cDNS	ACAAGCACTA	GCAACAACCTC	TATATCTGGA	TCATTGAAGC	GCTTGGAAGA
mRNS MLLT10 Ensembl	ACAAGCACTA	GCAACAACCTC	TATATCTGGA	TCATTGAAGC	GCTTGGAAGA
		1201			1250
Klon 8-28 cDNS	TACTACTGCA	CGATTTACAA	ATGCAAATTT	CCAGGAAGTC	TCTGCACACA
mRNS MLLT10 Ensembl	TACTACTGCA	CGATTTACAA	ATGCAAATTT	CCAGGAAGTC	TCTGCACACA
		1251			1300
Klon 8-28 cDNS	CCTCTAGTGG	AAAAGATGTT	TCAGAGACTA	GAGGGTCAGA	GGGCAAAGGG
mRNS MLLT10 Ensembl	CCTCTAGTGG	AAAAGATGTT	TCAGAGACTA	GAGGGTCAGA	GGGCAAAGGG
		1301			1350
Klon 8-28 cDNS	AAGAAATCTT	CAGCTCACAG	CTCAGGTCAA	AGGGGAAGAA	AGCCTGGTGG
mRNS MLLT10 Ensembl	AAGAAATCTT	CAGCTCACAG	CTCAGGTCAA	AGGGGAAGAA	AGCCTGGTGG
		1351			1400
					
Klon 8-28 cDNS	TGGAAGAAAT	CCAGGAACAA	CTGTGTCAGC	AGCTAGCCCT	TTTCCTCAAG
mRNS MLLT10 Ensembl	TGGAAGAAAT	CCAGGAACAA	CTGTGTCAGC	AGCTAGCCCT	TTTCCTCAAG
		1401			1450
Klon 8-28 cDNS	GTATTAGTGA	TGTTTTAGTT	AAAATACTTG	TGTTTAAGAT	GGTTAATAAT
mRNS MLLT10 Ensembl	Intron 10-11				
		1451			1500
Klon 8-28 cDNS	AGTTATGCTT	TGTTAAATAA	TTGGTTTGTT	TTTGAACCTA	TAACTAATGG
mRNS MLLT10 Ensembl					
		1501			1550
Klon 8-28 cDNS	ATGTTCTAGA	TTATTATATG	ATTAGTTGCT	TTAGTAAGAT	TACTTTAAAG
mRNS MLLT10 Ensembl					
		1551			1600
Klon 8-28 cDNS	ATAGTGTTTC	CTATTAAATT	TTTTTAATAG	GGACTTTTTTC	TTTCCTTTTA
mRNS MLLT10 Ensembl					
		1601			1650
Klon 8-28 cDNS	TAATATGATT	TGTGCTTCCA	GAGTTGAATT	GTAATTTTAA	TGTTTAACTA
mRNS MLLT10 Ensembl					


1651 1700
Klon 8-28 cDNS GATATGGAAT AATGCTTAAA ATTGGGGAGA AAAATAATAA AAGCTGGAGC
mRNS MLLT10 Ensembl

1701 1730
Klon 8-28 cDNS TTTGCTTTGA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA~
mRNS MLLT10 Ensembl

 Stopcodon

 Anfang Exon

Kursiv Intronsequenz

 Ende Exon

E. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon 11-23 mit der mRNS-Sequenz von C7 aus der Ensembl-Datenbank

	1901				1950
	Ex15				
Klon 11-23 cDNS	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~CAAAAACC	TTTCTACACA
mRNS C7 Ensembl	CTGTACTGAT	GGATGGCATA	CAGAGTCACC	CCCAAAAACC	TTTCTACACA
	1951				2000
Klon 11-23 cDNS	GTTGGTGAGA	AGGTGACTGT	TTCTCTGTTCA	GGTGGCATGT	CCTTAGAAGG
mRNS C7 Ensembl	GTTGGTGAGA	AGGTGACTGT	TTCTCTGTTCA	GGTGGCATGT	CCTTAGAAGG
	2001				2050
Klon 11-23 cDNS	TCCTTCAGCA	TTTCTCTGTG	GCTCCAGCCT	TAAGTGGAGT	CCTGAGATGA
mRNS C7 Ensembl	TCCTTCAGCA	TTTCTCTGTG	GCTCCAGCCT	TAAGTGGAGT	CCTGAGATGA
	2051		Ex16		2100
Klon 11-23 cDNS	AGAATGCCCG	CTGTGTACAA	AAAGAAAATC	CGTTAACACA	GGCAGTGCCT
mRNS C7 Ensembl	AGAATGCCCG	CTGTGTACAA	AAAGAAAATC	CGTTAACACA	GGCAGTGCCT
	2101				2150
Klon 11-23 cDNS	AAATGTCAGC	GCTGGGAGAA	ACTGCAGAAT	TCAAGATGTG	TTTGTAAAAAT
mRNS C7 Ensembl	AAATGTCAGC	GCTGGGAGAA	ACTGCAGAAT	TCAAGATGTG	TTTGTAAAAAT
	2151		Ex17		2200
Klon 11-23 cDNS	GCCCTACGAA	TGTGGACCTT	CCTTGATGT	ATGTGCTCAA	GATGAGAGAA
mRNS C7 Ensembl	GCCCTACGAA	TGTGGACCTT	CCTTGATGT	ATGTGCTCAA	GATGAGAGAA
	2201				2250
Klon 11-23 cDNS	GCAAAAGGAT	ACTGCCTCTG	ACAGTTTGCA	AGATGCATGT	TCTCCACTGT
mRNS C7 Ensembl	GCAAAAGGAT	ACTGCCTCTG	ACAGTTTGCA	AGATGCATGT	TCTCCACTGT
	2251				2300
Klon 11-23 cDNS	CAGGGTAGAA	ATTACACCTT	TACTGGTAGG	GACAGCTGTA	CTCTGCCTGC
mRNS C7 Ensembl	CAGGGTAGAA	ATTACACCTT	TACTGGTAGG	GACAGCTGTA	CTCTGCCTGC
	2301				2350
Klon 11-23 cDNS	CTCAGCTGAG	AAAGCTTGTG	GTGCCTGCCC	ACTGTGGGGA	AAATGTGATG
mRNS C7 Ensembl	CTCAGCTGAG	AAAGCTTGTG	GTGCCTGCCC	ACTGTGGGGA	AAATGTGATG
	2351				2400
	Ex18				
Klon 11-23 cDNS	CTGAGAGCAG	CAAATGTGTC	TGCCGAGAAG	CATCGGAGTG	CGAGGAAGAA
mRNS C7 Ensembl	CTGAGAGCAG	CAAATGTGTC	TGCCGAGAAG	CATCGGAGTG	CGAGGAAGAA
	2401				2450
Klon 11-23 cDNS	GGGTTTAGCA	TTTGTGTGGA	AGTGAACGGC	AAGGAGCAGA	CGATGTCTGA
mRNS C7 Ensembl	GGGTTTAGCA	TTTGTGTGGA	AGTGAACGGC	AAGGAGCAGA	CGATGTCTGA
	2451				2500
Klon 11-23 cDNS	GTGTGAGGCG	GGCGCTCTGA	GATGCAGAGG	GCAGAGCATC	TCTGTCACCA
mRNS C7 Ensembl	GTGTGAGGCG	GGCGCTCTGA	GATGCAGAGG	GCAGAGCATC	TCTGTCACCA


```




                2501                                     2550
Klon 11-23 cDNS GCATAAGGCC TTGTGCTGCG GAAACCCAGT AGGCTCCTGG AGGCCCTGGT
mRNS C7 Ensembl GCATAAGGCC TTGTGCTGCG GAAACCCAGT AGGCTCCTGG AGGCCCTGGT

                2551                                     2600
Klon 11-23 cDNS CAGCTTG~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
mRNS C7 Ensembl CAGCTTGCTT GGAATCCAGC AGGCAGCTGG GGCTGAGTGA AAACATCTGC

                2601                                     2650
Klon 11-23 cDNS ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
mRNS C7 Ensembl ACAACTGGGC ACTGGACAGC TTTTCCTTCT TCTCCAGTGT CTACCTTCCT

                2651                2667
Klon 11-23 cDNS ~~~~~ ~~~~~
mRNS C7 Ensembl CCTCAACTCC CAGCCAT

```

 Stopcodon
  Anfang Exon
  Ende Exon

F. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon 13-21 mit der mRNS-Sequenz von CYP1B1 aus der Ensembl-Datenbank

	2751				2800
	Ex3, 3' nicht translatierte Region				
Klon 13-21 cDNS	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
mRNS Cyp1B1 Ensembl	GTTGTACCTC	TTTTGCTTGC	CAAAGTACAG	AATTTGAATT	ATCAGCAAAG
	2801				2850
Klon 13-21 cDNS	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~TGTGACCA	TAATGTACTG
mRNS Cyp1B1 Ensembl	AAAAAAAAAA	AAGCCAGCCA	AGCTTTAAAT	TATGTGACCA	TAATGTACTG
	2851				2900
Klon 13-21 cDNS	ATTTTCAGTAA	GTCTCATAGG	T TAA AAAAAAA	AAGTCACCAA	ATAGTGTGAA
mRNS Cyp1B1 Ensembl	ATTTTCAGTAA	GTCTCATAGG	TTAAAAAAAA	AAGTCACCAA	ATAGTGTGAA
	2901				2950
Klon 13-21 cDNS	ATATATTACT	TAACTGTCCG	TAAGCAGTAT	ATTAGTATTA	TCTTGTTTCAG
mRNS Cyp1B1 Ensembl	ATATATTACT	TAACTGTCCG	TAAGCAGTAT	ATTAGTATTA	TCTTGTTTCAG
	2951				3000
Klon 13-21 cDNS	GAAAAGGTTG	AATAATATAT	GCCTTGTATA	ATATTGAAAA	TTGAAAAGTN
mRNS Cyp1B1 Ensembl	GAAAAGGTTG	AATAATATAT	GCCTTGTATA	ATATTGAAAA	TTGAAAAGTA
	3001				3050
Klon 13-21 cDNS	CAACTAACGC	AACCAAGTGT	GCTAAAAATG	AGCTTGATTA	AATCANCCAC
mRNS Cyp1B1 Ensembl	CAACTAACGC	AACCAAGTGT	GCTAAAAATG	AGCTTGATTA	AATCAACCAC
	3051				3100
Klon 13-21 cDNS	CTATTTTTGA	CATGG~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
mRNS Cyp1B1 Ensembl	CTATTTTTGA	CATGGAAATG	AAGCAGGGTT	TCTTTTCTTC	ACTCAAATTT
	3101				3150
Klon 13-21 cDNS	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
mRNS Cyp1B1 Ensembl	TGGCGAATCT	CAAAATTAGA	TCCTAAGATG	TGTTCTTATT	TTTATAACAT

TAA Stopcodon

G. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon 14-18 mit der mRNS-Sequenz von C7 aus der Ensembl-Datenbank

	1901				1950
	Ex15				
Klon 14-18 cDNSfor	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~CAAAAACC	TTTCTACACA
mRNS C7 Ensembl	CTGTACTGAT	GGATGGCATA	CAGAGTCACC	CCCAAAAACC	TTTCTACACA
	1951				2000
Klon 14-18 cDNSfor	GTTGGTGAGA	AGGTGACTGT	TTCCTGTTCA	GGTGGCATGT	CCTTAGAAGG
mRNS C7 Ensembl	GTTGGTGAGA	AGGTGACTGT	TTCCTGTTCA	GGTGGCATGT	CCTTAGAAGG
	2001				2050
Klon 14-18 cDNSfor	TCCTTCAGCA	TTTCTCTGTG	GCTCCAGCCT	TAAGTGGAGT	CCTGAGATGA
mRNS C7 Ensembl	TCCTTCAGCA	TTTCTCTGTG	GCTCCAGCCT	TAAGTGGAGT	CCTGAGATGA
	2051		Ex16		2100
Klon 14-18 cDNSfor	AGAATGCCCG	CTGTGTACAA	AAAGAAAATC	CGTTAACACA	GGCAGTGCCT
mRNS C7 Ensembl	AGAATGCCCG	CTGTGTACAA	AAAGAAAATC	CGTTAACACA	GGCAGTGCCT
	2101				2150
Klon 14-18 cDNSfor	AAATGTCAGC	GCTGGGAGAA	ACTGCAGAAT	TCAAGATGTG	TTTGTAAAAAT
mRNS C7 Ensembl	AAATGTCAGC	GCTGGGAGAA	ACTGCAGAAT	TCAAGATGTG	TTTGTAAAAAT
	2151	Ex17			2200
Klon 14-18 cDNSfor	GCCCTACGAA	TGTGGACCTT	CCTTGATGT	ATGTGCTCAA	GATGAGAGAA
mRNS C7 Ensembl	GCCCTACGAA	TGTGGACCTT	CCTTGATGT	ATGTGCTCAA	GATGAGAGAA
	2201				2250
Klon 14-18 cDNSfor	GCAAAAGGAT	ACTGCCTCTG	ACA~~~~~	~~~~~	~~~~~
mRNS C7 Ensembl	GCAAAAGGAT	ACTGCCTCTG	ACAGTTTGCA	AGATGCATGT	TCTCCACTGT
	2251				2300
Klon 14-18 cDNSfor	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
mRNS C7 Ensembl	CAGGGTAGAA	ATTACACCT	TACTGGTAGG	GACAGCTGTA	CTCTGCCTGC

➡ Anfang Exon

⬅ Ende Exon

H. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon 15-26 mit der mRNS-Sequenz von Col4A2 aus der Ensembl-Datenbank

	6051				6100
	Ex48,3' nicht translatierte Region				
Klon 15-26 cDNS	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~GTGGA	GACCCTTCTA
mRNS Col4A2 Ensembl	TATAGACCAC	TGGGTTTGGC	AAAAC TCAGG	CAGAAGTGGA	GACCTTTCTA
	6101				6150
Klon 15-26 cDNS	GACATCACTG	TCAGCCTTGC	TACTTGAAGG	TACACCCCAT	AGGGTCGGAG
mRNS Col4A2 Ensembl	GACATCATTG	TCAGCCTTGC	TACTTGAAGG	TACACCCCAT	AGGGTCGGAG
	6151				6200
Klon 15-26 cDNS	GTGCTGTCCC	CACTGCCCCA	CGTTGTCCCT	GAGATTTAAC	CCCTCCACTG
mRNS Col4A2 Ensembl	GTGCTGTCCC	CACTGCCCCA	CGTTGTCCCT	GAGATTTAAC	CCCTCCACTG
	6201				6250
Klon 15-26 cDNS	CTGGGGGTGA	GCTGTACTCT	TCTGACTGCC	CCCTCCTGTG	TAACGACTAC
mRNS Col4A2 Ensembl	CTGGGGGTGA	GCTGTACTCT	TCTGACTGCC	CCCTCCTGTG	TAACGACTAC
	6251				6297
Klon 15-26 cDNS	AAAATAAAAC	TTGGTTCTGA	ATATTTTAA	AAAAAAAAA	AAAAAAA
mRNS Col4A2 Ensembl	AAAATAAAAC	TTGGTTCTGA	ATATTTTAA	A~~~~~	~~~~~

 Stopcodon

I. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon 16-50 mit der gDNS-Sequenz von NPR1 aus der Ensembl-Datenbank


	12.248		12.300
	➡ Ex20		
Klon 16-50 cDNS	~~~~~GTG	GGAAGGTAC	CTGTCTCTTT
gDNS NPR1 Ensembl	GACCTGTGTGTC	TGGAGTGGTG	GGAAGGTAC
	12.301		12.350
			←
Klon 16-50 cDNS	GGGGATACAG	TCAACACAGC	CTCAAGAATG
gDNS NPR1 Ensembl	GGGGATACAG	TCAACACAGC	CTCAAGAATG
	12.351		12.400
Klon 16-50 cDNS	AGTGCCCCCT	CCTAGAGGGA	ATGGGGAGGG
gDNS NPR1 Ensembl	AGTGCCCCCT	CCTAGAGGGA	ATGGGGAGGG
	12.401		12.450
Klon 16-50 cDNS	CCATCCTGGG	GCAGCCTGTG	CCTGCACAGC
gDNS NPR1 Ensembl	CCATCCTGGG	GCAGCCTGTG	CCTGCACAGC
	12.451		12.500
Klon 16-50 cDNS	TTGCGCTCCC	AAGTTCCCCCT	TCTCATAATA
gDNS NPR1 Ensembl	TTGCGCTCCC	AAGTTCCCCCT	TCTCATAATA
	12.501		12.550
Klon 16-50 cDNS	CATCAACTTG	ACTGTAACCA	GAGACTCAGG
gDNS NPR1 Ensembl	CATCAACTTG	ACTGTAACCA	GAGACTCAGG
	12.551		12.600
Klon 16-50 cDNS	AAACGATGTA	AAAGTATTTTC	CGGGCCAGTG
gDNS NPR1 Ensembl	AAACGATGTA	AAAGTATTTTC	CGGGCCAGTG
	12.601		12.650
Klon 16-50 cDNS	ATCTGATTTT	AAGACCCTCT	GTGGGCCCGG
gDNS NPR1 Ensembl	ATCTGATTTT	AAGACCCTCT	GTGGGCCCGG
	12.651		12.700
Klon 16-50 cDNS	ATCCCAGCAC	TTTGGGAGGC	TGAGGCAGGC
gDNS NPR1 Ensembl	ATCCCAGCAC	TTTGGGAAGC	TGAGGCAGGC
	12.701		12.750
Klon 16-50 cDNS	TTTCGAGACCA	GCCTGACCAG	CGTGATGAGA
gDNS NPR1 Ensembl	TTTCGAGACCA	GCCTGACCAA	CATGATGAAA
	12.751		12.800
Klon 16-50 cDNS	CAAAAAACTA	GCCAGGTGTG	ATGGCAGGCT
gDNS NPR1 Ensembl	CAAAAAACTA	GCCAGGTGTG	ATGGCAGGCT
	12.801		12.850
Klon 16-50 cDNS	GGAGGCTGAG	GCGGGGGAAT	TGCTTGAACC
gDNS NPR1 Ensembl	GGAGGCTGAG	GCAGAAGAAT	TGCTTGAACC
	12.851		12.900
Klon 16-50 cDNS	GAGCCGAGAT	TGCACCACGC	ACCCCAGCTT
gDNS NPR1 Ensembl	GAGCCAAGAT	TACACCACGC	ACCCCAGCTT



	12.901		12.950
Klon 16-50 cDNS	TGTCTCAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA~ ~~~~~~ ~~~~~~
gDNS NPR1 Ensembl	TGTCTCAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA AAAGACCCTC TGCTCCACCT

 Stopcodon  Anfang Exon  Ende Exon *Kursiv* Intron Sequenz

J. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon 18-12 mit der mRNS-Sequenz von OFD1 aus der Ensembl-Datenbank

	2701	Ex19		2750
Klon 18-12 cDNS	~~~~~	~~~~~TTTA	TCGAAGACAA	ACTGAACTTC AAGACAAAAG
mRNS OFD1 Ensembl	GAGCAGAAAG	TGGGTCTT	TA TCGAAGACAA	ACTGAACTTC AAGACAAAAG
	2751			2800
Klon 18-12 cDNS	TGAATTTTCA	GATGTGGACA	AGCTAGCTTT	TAAGGATAAT GAGGAGTTTG
mRNS OFD1 Ensembl	TGAATTTTCA	GATGTGGACA	AGCTAGCTTT	TAAGGATAAT GAGGAGTTTG
	2801	Ex20		2850
Klon 18-12 cDNS	AATCATCTTT	TGAATCTGCA	GGGAACATGC	CAAGGCAGTT GGAAATGGGC
mRNS OFD1 Ensembl	AATCATCTTT	TGAATCTGCA	GGGAACATGC	CAAGGCAGTT GGAAATGGGC
	2851			2900
Klon 18-12 cDNS	GGGCTTTCTC	CTGCCGGGGA	TATGTCTCAT	GTGGACGCTG CTGCAGCTGC
mRNS OFD1 Ensembl	GGGCTTTCTC	CTGCCGGGGA	TATGTCTCAT	GTGGACGCTG CTGCAGCTGC
	2901	Ex21		2950
Klon 18-12 cDNS	TGTGCCCCTC	TCATATCAGC	ACCCNAGTGT	AGATCAGAAA CAAATTGAAG
mRNS OFD1 Ensembl	TGTGCCCCTC	TCATATCAGC	ACCCAAGTGT	AGATCAGAAA CAAATTGAAG
	2951			3000
Klon 18-12 cDNS	AACAAAAGGA	AGAAGAAAAA	ATACGGGAAC	AGCAAGTGAA AGA~~~~~
mRNS OFD1 Ensembl	AACAAAAGGA	AGAAGAAAAA	ATACGGGAAC	AGCAAGTGAA AGAACGAAGG
	3001			3050
Klon 18-12 cDNS	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
mRNS OFD1 Ensembl	CAGAGAGAAG	AAAGAAGGCA	GAGTAACCTA	CAAGAAGTTT TAGAAAGGGA

 Stopcodon  Anfang Codon

 Leserahmen  Ende Codon

K. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon IRATp970E0794D mit der mRNS-Sequenz von C7 aus der NCBI-Datenbank

	1				50
mRNS C7 NCBI	AGGGAGAGGC	AGAGAGGCAG	GCAGCCTGCT	GGGCTCTTCC	TGCTGTTGAA
Klon IRATp970E0794D	~~~~~	~~~~~G	GCAGCCTGCT	GGGCTCTTCC	TGCTGTTGAA
	51				100
mRNS C7 NCBI	AACTTACCCG	GCCCTTACAG	AGGAAATCTT	CCTCCTCTCT	TCTGCCCTGA
Klon IRATp970E0794D	AACTTACCCG	GCCCTTACAG	AGGAAATCTT	CCTCCTCTCT	TCTGCCCTGA
	101				150
mRNS C7 NCBI	ATGTTTTCCC	AAACATGAAG	GTGATAAGCT	TATTCATTTT	GGTGGGATTT
Klon IRATp970E0794D	ATGTTTTCCC	AAACATGAAG	GTGATAAGCT	TATTCATTTT	GGTGGGATTT
	151				200
mRNS C7 NCBI	ATAGGAGAGT	TCCAAAGTTT	TTCAAGTGCC	TCCTCTCCAG	TCAACTGCCA
Klon IRATp970E0794D	ATAGGAGAGT	TCCAAAGTTT	TTCAAGTGCC	TCCTCTCCAG	TCAACTGCCA
	201				250
mRNS C7 NCBI	GTGGGACTTC	TATGCCCCCTT	GGTCAGAATG	CAATGGCTGT	ACCAAGACTC
Klon IRATp970E0794D	GTGGGACTTC	TATGCCCCCTT	GGTCAGAATG	CAATGGCTGT	ACCAAGACTC
	251				300
mRNS C7 NCBI	AGACTCGCAG	GCGGTCAGTT	GCTGTGTATG	GGCAGTATGG	AGGCCAGCCT
Klon IRATp970E0794D	AGACTCGCAG	GCGGTCAGTT	GCTGTGTATG	GGCAGTATGG	AGGCCAGCCT
	301				350
mRNS C7 NCBI	TGTGTTGGAA	ATGCTTTTGA	AACACAGTCC	TGTGAACCTA	CAAGAGGATG
Klon IRATp970E0794D	TGTGTTGGAA	ATGCTTTTGA	AACACAGTCC	TGTGAACCTA	CAAGAGGATG
	351				400
mRNS C7 NCBI	TCCAACAGAG	GAGGGATGTG	GAGAGCGTTT	CAGGTGCTTT	TCAGGTCAGT
Klon IRATp970E0794D	TCCAACAGAG	GAGGGATGTG	GAGAGCGTTT	CAGGTGCTTT	TCAGGTCAGT
	401				450
mRNS C7 NCBI	GCATCAGCAA	ATCATTGGTT	TGCAATGGGG	ATTCTGACTG	TGATGAAGAC
Klon IRATp970E0794D	GCATCAGCAA	ATCATTGGTT	TGCAATGGGG	ATTCTGACTG	TGATGAAGAC
	451				500
mRNS C7 NCBI	AGTGCTGATG	AAGACAGATG	TGAGGACTCA	GAAAGGAGAC	CTTCCTGTGA
Klon IRATp970E0794D	AGTGCTGATG	AAGACAGATG	TGAGGACTCA	GAAAGGAGAC	CTTCCTGTGA
	501				550
mRNS C7 NCBI	TATCGATAAA	CCTCCTCCTA	ACATAGAACT	TACTGGAAAT	GGTTACAATG
Klon IRATp970E0794D	TATCGATAAA	CCTCCTCCTA	ACATAGAACT	TACTGGAAAT	GGTTACAATG
	551				600
mRNS C7 NCBI	AACTCACTGG	CCAGTTTAGG	AACAGAGTCA	TCAATACCAA	AAGTTTTGGT
Klon IRATp970E0794D	AACTCACTGG	CCAGTTTAGG	AACAGAGTCA	TCAATACCAA	AAGTTTTGGT
	601				650
mRNS C7 NCBI	GGTCAATGTA	GAAAGGTGTT	TAGTGGGGAT	GGAAAAGATT	TCTACAGGCT
Klon IRATp970E0794D	GGTCAATGTA	GAAAGGTGTT	TAGTGGGGAT	GGAAAAGATT	TCTACAGGCT



	651				700
mRNS C7 NCBI	GAGTGGAAAT	GTCCTGTCCT	ATACATTCCA	GGTGAAAAATA	AATAATGATT
Klon IRATp970E0794D	GAGTGGAAAT	GTCCTGTCCT	ATACATTCCA	GGTGAAAAATA	AATAATGATT
	701				750
mRNS C7 NCBI	TTAATTATGA	ATTTTACAAT	AGTACTTGGT	CTTATGTAAA	ACATACGTCG
Klon IRATp970E0794D	TTAATTATGA	ATTTTACAAT	AGTACTTGGT	CTTATGTAAA	ACATACGTCG
	751				800
mRNS C7 NCBI	ACAGAACACA	CATCATCTAG	TCGGAAGCGC	TCCTTTTTTTA	GATCTTCATC
Klon IRATp970E0794D	ACAGAACACA	CATCATCTAG	TCGGAAGCGC	TCCTTTTTTTA	GATCTTCATC
	801				850
mRNS C7 NCBI	ATCTTCTTCA	CGCAGTTATA	CTTCACATAC	CAATGAAATC	CATAAAGGAA
Klon IRATp970E0794D	ATCTTCTTCA	CGCAGTTATA	CTTCACATAC	CAATGAAATC	CATAAAGGAA
	851				900
mRNS C7 NCBI	AGAGTTACCA	ACTGCTGGTT	GTTGAGAACA	CTGTTGAAAGT	GGCTCAGTTC
Klon IRATp970E0794D	AGAGTTACCA	ACTGCTGGTT	GTTGAGAACA	CTGTTGAAAGT	GGCTCAGTTC
	901				950
mRNS C7 NCBI	ATTAATAACA	ATCCAGAATT	TTTACAACCTT	GCTGAGCCAT	TCTGGAAGGA
Klon IRATp970E0794D	ATTAATAACA	ATCCAGAATT	TTTACAACCTT	GCTGAGCCAT	TCTGGAAGGA
	951				1000
mRNS C7 NCBI	GCTTTCCAC	CTCCCCCTCTC	TGTATGACTA	CAGTGCCTAC	CGAAGATTAA
Klon IRATp970E0794D	GCTTTCCAC	CTCCCCCTCTC	TGTATGACTA	CAGTGCCTAC	CGAAGATTAA
	1001				1050
mRNS C7 NCBI	TCGACCAGTA	CGGGACACAT	TATCTGCAAT	CTGGGTCGTT	AGGAGGAGAA
Klon IRATp970E0794D	TCGACCAGTA	CGGGACACAT	TATCTGCAAT	CTGGGTCGTT	AGGAGGAGAA
	1051				1100
mRNS C7 NCBI	TACAGAGTTC	TATTTTATGT	GGACTCAGAA	AAATTAAAAAC	AAAATGATTT
Klon IRATp970E0794D	TACAGAGTTC	TATTTTATGT	GGACTCAGAA	AAATTAAAAAC	AAAATGATTT
	1101				1150
mRNS C7 NCBI	TAATTCAGTC	GAAGAAAAGA	AATGTAAATC	CTCAGGTTGG	CATTTTGTCG
Klon IRATp970E0794D	TAATTCAGTC	GAAGAAAAGA	AATGTAAATC	CTCAGGTTGG	CATTTTGTCG
	1151				1200
mRNS C7 NCBI	TTAAATTTTC	AAGTCATGGA	TGCAAGGAAC	TGAAAAACGC	TTTAAAAGCT
Klon IRATp970E0794D	TTAAATTTTC	AAGTCATGGA	TGCAAGGAAC	TGAAAAACGC	TTTAAAAGCT
	1201				1250
mRNS C7 NCBI	GCTTCAGGAA	CCCAGAACAA	TGTATTGCGA	GGAGAACCGT	TCATCAGAGG
Klon IRATp970E0794D	GCTTCAGGAA	CCCAGAACAA	TGTATTGCGA	GGAGAACCGT	TCATCAGAGG
	1251				1300
mRNS C7 NCBI	GGGAGGTGCA	GGCTTCATAT	CTGGCCTTAG	TTACCTAGAG	CTGGACAATC
Klon IRATp970E0794D	GGGAGGTGCA	GGCTTCATAT	CTGGCCTTAG	TTACCTAGAG	CTGGACAATC
	1301				1350
mRNS C7 NCBI	CTGCTGGAAA	CAAAAGGCGA	TATTCTGCCT	GGGCAGAAATC	TGTGACTAAT
Klon IRATp970E0794D	CTGCTGGAAA	CAAAAGGCGA	TATTCTGCCT	GGGCAGAAATC	TGTGACTAAT
	1351				1400
mRNS C7 NCBI	CTTCCTCAAG	TCATAAAACA	AAAGCTGACA	CCTTTATATG	AGCTGGTAAA
Klon IRATp970E0794D	CTTCCTCAAG	TCATAAAACA	AAAGCTGACA	CCTTTATATG	AGCTGGTAAA

	1401				1450
mRNS C7 NCBI	GGAAGTACCT	TGTGCCTCTG	TGAAAAAACT	ATACCTGAAA	TGGGCTCTTG
Klon IRATp970E0794D	GGAAGTACCT	TGTGCCTCTG	TGAAAAAACT	ATACCTGAAA	TGGGCTCTTG
	1451				1500
mRNS C7 NCBI	AAGAGTATCT	GGATGAATTT	GACCCCTGTC	ATTGCCGGCC	TTGTCAAAAT
Klon IRATp970E0794D	AAGAGTATCT	GGATGAATTT	GACCCCTGTC	ATTGCCGGCC	TTGTCAAAAT
	1501				1550
mRNS C7 NCBI	GGTGGTTTGG	CTACTGTTGA	GGGGACCCAT	TGTCTGTGCC	ATTGCAAACC
Klon IRATp970E0794D	GGTGGTTTGG	CTACTGTTGA	GGGGACCCAT	TGTCTGTGCC	ATTGCAAACC
	1551				1600
mRNS C7 NCBI	GTACACATTT	GGTGCGGCGT	GTGAGCAAGG	AGTCCTCGTA	GGGAATCAAG
Klon IRATp970E0794D	GTACACATTT	GGTGCGGCGT	GTGAGCAAGG	AGTCCTCGTA	GGGAATCAAG
	1601				1650
mRNS C7 NCBI	CAGGAGGGGT	TGATGGAGGT	TGGAGTTGCT	GGTCCTCTTG	GAGCCCCGTG
Klon IRATp970E0794D	CAGGAGGGGT	TGATGGAGGT	TGGAGTTGCT	GGTCCTCTTG	GAGCCCCGTG
	1651				1700
mRNS C7 NCBI	GTCCAAGGGA	AGAAAACAAG	AAGCCGTGAA	TGCAATAACC	CACCTCCAG
Klon IRATp970E0794D	GTCCAAGGGA	AGAAAACAAG	AAGCCGTGAA	TGCAATAACC	CACCTCCAG
	1701				1750
mRNS C7 NCBI	TGGGGGTGGG	AGATCCTGCG	TTGGAGAAAC	GACAGAAAAGC	ACACAATGCG
Klon IRATp970E0794D	TGGGGGTGGG	AGATCCTGCG	TTGGAGAAAC	GACAGAAAAGC	ACACAATGCG
	1751				1800
mRNS C7 NCBI	AAGATGAGGA	GCTGGAGCAC	TTGAGGTTGC	TTGAACCACA	TTGCTTTCCT
Klon IRATp970E0794D	AAGATGAGGA	GCTGGAGCAC	TTGAGGTTGC	TTGAACCACA	TTGCTTTCCT
	1801				1850
mRNS C7 NCBI	TTGTCTTTGG	TTCCAACAGA	ATTCTGTCCA	TCACCTCCTG	CCTTGAAAGA
Klon IRATp970E0794D	TTGTCTTTGG	TTCCAACAGA	ATTCTGTCCA	TCACCTCCTG	CCTTGAAAGA
	1851				1900
mRNS C7 NCBI	TGGATTTGTT	CAAGATGAAG	GTACAATGTT	TCCTGTGGGG	AAAAATGTAG
Klon IRATp970E0794D	TGGATTTGTT	CAAGATGAAG	GTACAATGTT	TCCTGTGGGG	AAAAATGTAG
	1901				1950
mRNS C7 NCBI	TGTACACTTG	CAATGAAGGA	TACTCTCTTA	TTGGAAACCC	AGTGGCCAGA
Klon IRATp970E0794D	TGTACACTTG	CAATGAAGGA	TACTCTCTTA	TTGGAAACCC	AGTGGCCAGA
	1951				2000
mRNS C7 NCBI	TGTGGAGAAG	ATTTACGGTG	GCTTGTTGGG	GAAATGCATT	GTCAGAAAAT
Klon IRATp970E0794D	TGTGGAGAAG	ATTTACGGTG	GCTTGTTGGG	GAAATGCATT	GTCAGAAAAT
	2001				2050
mRNS C7 NCBI	TGCCTGTGTT	CTACCTGTAC	TGATGGATGG	CATACAGAGT	CACCCCCAAA
Klon IRATp970E0794D	TGCCTGTGTT	CTACCTGTAC	TGATGGATGG	CATACAGAGT	CACCCCCAAA
	2051				2100
mRNS C7 NCBI	AACCTTTCTA	CACAGTTGGT	GAGAAGGTGA	CTGTTTCCTG	TTCAGGTGGC
Klon IRATp970E0794D	AACCTTTCTA	CACAGTTGGT	GAGAAGGTGA	CTGTTTCCTG	TTCAGGTGGC
	2101				2150
mRNS C7 NCBI	ATGTCCTTAG	AAGGTCCTTC	AGCATTTCTC	TGTGGCTCCA	GCCTTAAGTG
Klon IRATp970E0794D	ATGTCCTTAG	AAGGTCCTTC	AGCATTTCTC	TGTGGCTCCA	GCCTTAAGTG

	2151				2200
mRNS C7 NCBI	GAGTCCTGAG	ATGAAGAATG	CCCGCTGTGT	ACAAAAAGAA	AATCCGTTAA
Klon IRATp970E0794D	GAGTCCTGAG	ATGAAGAATG	CCCGCTGTGT	ACAAAAAGAA	AATCCGTTAA
	2201				2250
mRNS C7 NCBI	CACAGGCAGT	GCCTAAATGT	CAGCGCTGGG	AGAAACTGCA	GAATTCAAGA
Klon IRATp970E0794D	CACAGGCAGT	GCCTAAATGT	CAGCGCTGGG	AGAAACTGCA	GAATTCAAGA
	2251				2300
mRNS C7 NCBI	TGTGTTTGTA	AAATGCCCTA	CGAATGTGGA	CCTTCCTTGG	ATGTATGTGC
Klon IRATp970E0794D	TGTGTTTGTA	AAATGCCCTA	CGAATGTGGA	CCTTCCTTGG	ATGTATGTGC
	2301				2350
mRNS C7 NCBI	TCAAGATGAG	AGAAGCAAAA	GGATACTGCC	TCTGACAGTT	TGCAAGATGC
Klon IRATp970E0794D	TCAAGATGAG	AGAAGCAAAA	GGATACTGCC	TCTGACAGTT	TGCAAGATGC
	2351				2400
mRNS C7 NCBI	ATGTTCTCCA	CTGTCAGGGT	AGAAATTACA	CCCTTACTGG	TAGGGACAGC
Klon IRATp970E0794D	ATGTTCTCCA	CTGTCAGGGT	AGAAATTACA	CCCTTACTGG	TAGGGACAGC
	2401				2450
mRNS C7 NCBI	TGTACTCTGC	CTGCCTCAGC	TGAGAAAGCT	TGTGGTGCCT	GCCCACTGTG
Klon IRATp970E0794D	TGTACTCTGC	CTGCCTCAGC	TGAGAAAGCT	TGTGGTGCCT	GCCCACTGTG
	2451				2500
mRNS C7 NCBI	GGGAAAATGT	GATGCTGAGA	GCAGCAAATG	TGTCTGCCGA	GAAGCATCGG
Klon IRATp970E0794D	GGGAAAATGT	GATGCTGAGA	GCAGCAAATG	TGTCTGCCGA	GAAGCATCGG
	2501				2550
mRNS C7 NCBI	AGTGCGAGGA	AGAAGGGTTT	AGCATTTGTG	TGGAAGTGAA	CGGCAAGGAG
Klon IRATp970E0794D	AGTGCGAGGA	AGAAGGGTTT	AGCATTTGTG	TGGAAGTGAA	CGGCAAGGAG
	2551				2600
mRNS C7 NCBI	CAGACGATGT	CTGAGTGTGA	GGCGGGCGCT	CTGAGATGCA	GAGGGCAGAG
Klon IRATp970E0794D	CAGACGATGT	CTGAGTGTGA	GGCGGGCGCT	CTGAGATGCA	GAGGGCAGAG
	2601				2650
mRNS C7 NCBI	CATCTCTGTC	ACCAGCATAA	GGCCTTGTGC	TGCGGAAACC	CAGTAGGCTC
Klon IRATp970E0794D	CATCTCTGTC	ACCAGCATAA	GGCCTTGTGC	TGCGGAAACC	CAGTAGGCTC
	2651				2700
mRNS C7 NCBI	CTGGAGGCC	TGGTCAGCTT	GCTTGGAATC	CAGCAGGCAG	CTGGGGCTGA
Klon IRATp970E0794D	CTGGAGGCC	TGGTCAGCTT	GCTTGGAATC	CAGCAGGCAG	CTGGGGCTGA
	2701				2750
mRNS C7 NCBI	GTGAAAACAT	CTGCACAACT	GGGCACTGGA	CAGCTTTTCC	TTCTTCTCCA
Klon IRATp970E0794D	GTGAAAACAT	CTGCACAACT	GGGCACTGGA	CAGCTTTTCC	TTCTTCTCCA
	2751				2800
mRNS C7 NCBI	GTGTCTACCT	TCCTCCTCAA	CTCCCAGCCA	TCTGTATAAA	CACAATCCTT
Klon IRATp970E0794D	GTGTCTACCT	TCCTCCTCAA	CTCCCAGCCA	TCTGTATAAA	CACAATCCTT
	2801				2850
mRNS C7 NCBI	TGTTCTCCCA	AATCTGAATC	GAATTACTCT	TTTGCTCCT	TTTTAATGTC
Klon IRATp970E0794D	TGTTCTCCCA	AATCTGAATC	GAATTACTCT	TTTGCTCCT	TTTTAATGTC
	2851				2900
mRNS C7 NCBI	AGTAAGGATA	TGAGCCTTTG	CACAGGCTGG	CTGCGTGTTC	TTGAAATAGG
Klon IRATp970E0794D	AGTAAGGATA	TGAGCCTTTG	CACAGGCTGG	CTGCGTGTTC	TTGAAATAGG

	2901				2950
mRNS C7 NCBI	TGTTACCTTC	TCTGGGCCTT	GGTTTTTTTAA	AATCTGTAAA	ATTAGAGGAT
Klon IRATp970E0794D	TGTTACCTTC	TCTGGGCCTT	GGTTTTTTTAA	AATCTGTAAA	ATTAGAGGAT
	2951				3000
mRNS C7 NCBI	TGCTACTAGAG	AAACTTGAAT	GCTCCATTCA	GGCCTATCAT	TTTATTAAGT
Klon IRATp970E0794D	TGCTACTAGAG	AAACTTGAAT	GCTCCATTCA	GGCCTATCAT	TTTATTAAGT
	3001				3050
mRNS C7 NCBI	ATGATTGACA	CAGCCCATGG	GCCAGAACAC	ACTCTACAAA	ATGACTAGGA
Klon IRATp970E0794D	ATGATTGACA	CAGCCCATGG	GCCAGAACAC	ACTCTACAAA	ATGACTAGGA
	3051				3100
mRNS C7 NCBI	TAACAGAAAG	AACGTGATCT	CCTGATTAGA	GAGGGTGGTT	TTCTCTCAATG
Klon IRATp970E0794D	TAACAGAAAG	AACGTGATCT	CCTGATTAGA	GAGGGTGGTT	TTCTCTCAATG
	3101				3150
mRNS C7 NCBI	GAACCAAATA	TAAAGAGGAC	TTGAACAAAA	ATGACAGATA	CAAACCTATTT
Klon IRATp970E0794D	GAACCAAATA	TAAAGAGGAC	TTGAACAAAA	ATGACAGATA	CAAACCTATTT
	3151				3200
mRNS C7 NCBI	CTATCCTGAG	TAGTAATCTC	ACACTTCATC	CTATAGAGTC	AACCACCACA
Klon IRATp970E0794D	CTATCCTGAG	TAGTAATCTC	ACACTTCATC	CTATAGAGTC	AACCACCACA
	3201				3250
mRNS C7 NCBI	GATAGGAATT	CCTTATTCTT	TTTTTAATTT	TTTTAAGACA	GAGTCTCACT
Klon IRATp970E0794D	GATAGGAATT	CCTTATTCTT	TTTTTAATTT	TTTTAAGACA	GAGTCTCACT
	3251				3300
mRNS C7 NCBI	TTGTTGCCCA	GGCTGGAGCG	CAGTGGGGTG	ATCTCATCTC	CCTGCAACCT
Klon IRATp970E0794D	TTGTTGCCCA	GGCTGGAGCG	CAGTGGGGTG	ATCTCATCTC	CCTGCAACCT
	3301				3350
mRNS C7 NCBI	CCGCCTCCTG	GGTTCAAGCG	ATTCTTGTGC	CTCAGCTTCC	CAAGCAGCTG
Klon IRATp970E0794D	CCGCCTCCTG	GGTTCAAGCG	ATTCTTGTGC	CTCAGCTTCC	CAAGCAGCTG
	3351				3400
mRNS C7 NCBI	GGATTACAGG	TGCCCCGCCAC	CACGCCCAGC	TAATTTTTGC	ATTTTTAGTA
Klon IRATp970E0794D	GGATTACAGG	TGCCCCGCCAC	CACGCCCAGC	TAATTTTTGC	ATTTTTAGTA
	3401				3450
mRNS C7 NCBI	GAGATGGGGT	TTCACCATGT	TGGCCACGCT	CGTCTCCAAC	TCCTGACCTC
Klon IRATp970E0794D	GAGATGGGGT	TTCACCATGT	TGGCCACGCT	CGTCTCCAAC	TCCTGACCTC
	3451				3500
mRNS C7 NCBI	AGGTAATCCG	CCTGCCTTGG	CCTCCCAAAG	TGCTGGGATT	ACAGACATGA
Klon IRATp970E0794D	AGGTAATCCG	CCTGCCTTGG	CCTCCCAAAG	TGCTGGGATT	ACAGACATGA
	3501				3550
mRNS C7 NCBI	ACCACCACGC	CTGGCTGGAA	TACTTACTCT	TGTCGGGAGA	TTGAACCACT
Klon IRATp970E0794D	ACCACCACGC	CTGGCTGGAA	TACTTACTCT	TGTCGGGAGA	TTGAACCACT
	3551				3600
mRNS C7 NCBI	AAAATGTTAG	AGCAGAATTC	ATTATGCTGT	GGTCACAGGG	GTGTCTTGTC
Klon IRATp970E0794D	AAAATGTTAG	AGCAGAATTC	ATTATGCTGT	GGTCACAGGG	GTGTCTTGTC
	3601				3650
mRNS C7 NCBI	TGAGAACAAA	TACAATTCAG	TCTTCTCTTT	GGGGTTTTAG	TATGTGTCAA
Klon IRATp970E0794D	TGAGAACAAA	TACAATTCAG	TCTTCTCTTT	GGGGTTTTAG	TATGTGTCAA

		3651				3700
mRNS C7 NCBI		ACATAGGACT	GGAAGTTTGC	CCCTGTTCTT	TTTTCTTTTG	AAAGAACATC
Klon IRATp970E0794D		ACATAGGACT	GGAAGTTTGC	CCCTGTTCTT	TTTTCTTTTG	AAAGAACATC
		3701				3750
mRNS C7 NCBI		AGTTCATGCC	TGAGGCATGA	GTGACTGTGC	ATTTGAGAAT	AGTTTTCCTT
Klon IRATp970E0794D		AGTTCATGCC	TGAGGCATGA	GTGACTGTGC	ATTTGAGAAT	AGTTTTCCTT
		3751				3800
mRNS C7 NCBI		ATTCTGTGGA	TACAGTCCCA	GAGTTTTTCAG	GGAGTACACA	GGTAGATTAG
Klon IRATp970E0794D		ATTCTGTGGA	TACAGTCCCA	GAGTTTTTCAG	GGAGTACACA	GGTAGATTAG
		3801				3850
mRNS C7 NCBI		TTTGAAGCAT	TGACCTTTTA	TTTATTCCTT	ATTTCTCTTT	CATCAAAACA
Klon IRATp970E0794D		TTTGAAGCAT	TGACCTTTTA	TTTATTCCTT	ATTTCTCTTT	CATCAAAACA
		3851				3900
mRNS C7 NCBI		AAACAGCAGC	TGTGGGAGGA	GAAATGAGAG	GGCTTAAATG	AAATTTAAAA
Klon IRATp970E0794D		AAACAGCAGC	TGTGGGAGGA	GAAATGAGAG	GGCTTAAATG	AAATTTAAAA
		3901				3950
mRNS C7 NCBI		TAAGCTATAT	TATACAAATA	CTATCTCTGT	ATTGTTCTGA	CCCTGGTAAA
Klon IRATp970E0794D		TAAGCTATAT	TATACAAATA	CTATCTCTGT	ATTGTTCTGA	CCCTGGTAAA
		3951				4000
mRNS C7 NCBI		TATATTTCAA	AACTTCAGAT	GACAAGGATT	AGAACACTCA	TTAAAGATGC
Klon IRATp970E0794D		TATATTTCAA	AACTTCAGAT	GACAAGGATT	AGAACACTCA	TTAAAGATGC
		4001			4034	
mRNS C7 NCBI		TATTCTTCAG	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAA	
Klon IRATp970E0794D		TATTCTTCAG	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAA	

 Translationsstartpunkt  Stopcodon

L. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon IRAKp961A12133Q mit der mRNS-Sequenz von NPR1 aus der Ensembl-Datenbank

	1				50
Klon IRAKp961A12133Q	GGTTCCCTCC	GGATAGCCGG	AGACTTGGGC	CGGCCGGACG	CCCCTTCTGG
mRNS NPR1 Ensembl	GGTTCCCTCC	GGATAGCCGG	AGACTTGGGC	CGGCCGGACG	CCCCTTCTGG
	51				100
Klon IRAKp961A12133Q	CACACTCCCT	GGGGCAGGCG	CTCACGCACG	CTACAAACAC	ACACTCCTCT
mRNS NPR1 Ensembl	CACACTCCCT	GGGGCAGGCG	CTCACGCACG	CTACAAACAC	ACACTCCTCT
	101				150
Klon IRAKp961A12133Q	TTCTTCCCTC	GCGCGCCCTC	TCTCATCCTT	CTTCACGAAG	CGCTCACTCG
mRNS NPR1 Ensembl	TTCTTCCCTC	GCGCGCCCTC	TCTCATCCTT	CTTCACGAAG	CGCTCACTCG
	151				200
Klon IRAKp961A12133Q	CACCCTTTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCT..	AACACGCACG	CACACTCCCA
mRNS NPR1 Ensembl	CACCCTTTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	AACACGCACG	CACACTCCCA
	201				250
Klon IRAKp961A12133Q	GTTGTTTACA	CTCGGGTCCT	CTCCAGCCCG	ACGTTCTCCT	GGCACCCACC
mRNS NPR1 Ensembl	GTTGTTTACA	CTCGGGTCCT	CTCCAGCCCG	ACGTTCTCCT	GGCACCCACC
	251				300
Klon IRAKp961A12133Q	TGCTCCGCGG	CGCCCTGCGC	GCCCCCTCG	GTCGCGCCCC	TTGCGCTCTC
mRNS NPR1 Ensembl	TGCTCCGCGG	CGCCCTGCGC	GCCCCCTCG	GTCGCGCCCC	TTGCGCTCTC
	301				350
Klon IRAKp961A12133Q	GGCCCAGACC	GTCGCAGCTA	CAGGGGGCCT	CGAGCCCCGG	GGTGAGCGTC
mRNS NPR1 Ensembl	GGCCCAGACC	GTCGCAGCTA	CAGGGGGCCT	CGAGCCCCGG	GGTGAGCGTC
	351				400
Klon IRAKp961A12133Q	CCCGTCCCGC	TCCTGCTCCT	TCCCATAGGG	ACGCGCCTGA	TGCCTGGGAC
mRNS NPR1 Ensembl	CCCGTCCCGC	TCCTGCTCCT	TCCCATAGGG	ACGCGCCTGA	TGCCTGGGAC
	401				450
Klon IRAKp961A12133Q	CGGCCGCTGA	GCCCAAGGGG	ACCGAGGAGG	CCATGGTAGG	AGCGCTCGCC
mRNS NPR1 Ensembl	CGGCCGCTGA	GCCCAAGGGG	ACCGAGGAGG	CCATGGTAGG	AGCGCTCGCC
	451				500
Klon IRAKp961A12133Q	TGCTGCGGTG	CCCGCTGAGG	CCATGCCGGG	GCCCCGGCGC	CCCGCTGGCT
mRNS NPR1 Ensembl	TGCTGCGGTG	CCCGCTGAGG	CCATGCCGGG	GCCCCGGCGC	CCCGCTGGCT
	501				550
Klon IRAKp961A12133Q	CCCGCCTGCG	CCTGCTCCTG	CTCCTGCTGC	TGCCGCCGCT	GCTGCTGCTG
mRNS NPR1 Ensembl	CCCGCCTGCG	CCTGCTCCTG	CTCCTGCTGC	TGCCGCCGCT	GCTGCTGCTG
	551				600
Klon IRAKp961A12133Q	CTCCGGGGCA	GCCACGCGGG	CAACCTGACG	GTAGCCGTGG	TACTGCCGCT
mRNS NPR1 Ensembl	CTCCGGGGCA	GCCACGCGGG	CAACCTGACG	GTAGCCGTGG	TACTGCCGCT
	601				650
Klon IRAKp961A12133Q	GGCCAATACC	TCGTACCCCT	GGTCGTGGGC	GCGCGTGGGA	CCCGCCGTGG
mRNS NPR1 Ensembl	GGCCAATACC	TCGTACCCCT	GGTCGTGGGC	GCGCGTGGGA	CCCGCCGTGG

	651				700
Klon IRAKp961A12133Q	AGCTGGCCCT	GGCCCAGGTG	AAGGCGCGCC	CCGACTTGCT	GCCGGGCTGG
mRNS NPR1 Ensembl	AGCTGGCCCT	GGCCCAGGTG	AAGGCGCGCC	CCGACTTGCT	GCCGGGCTGG
	701				750
Klon IRAKp961A12133Q	ACGGTCCGCA	CGGTGCTGGG	CAGCAGCGAA	AACGCGCTGG	GCGTCTGCTC
mRNS NPR1 Ensembl	ACGGTCCGCA	CGGTGCTGGG	CAGCAGCGAA	AACGCGCTGG	GCGTCTGCTC
	751				800
Klon IRAKp961A12133Q	CGACACCGCA	GCGCCCCCTGG	CCGCGGTGGA	CCTCAAGTGG	GAGCACAACC
mRNS NPR1 Ensembl	CGACACCGCA	GCGCCCCCTGG	CCGCGGTGGA	CCTCAAGTGG	GAGCACAACC
	801				850
Klon IRAKp961A12133Q	CCGCTGTGTT	CCTGGGCCCC	GGCTGCGTGT	ACGCCGCCGC	CCCAGTGGGG
mRNS NPR1 Ensembl	CCGCTGTGTT	CCTGGGCCCC	GGCTGCGTGT	ACGCCGCCGC	CCCAGTGGGG
	851				900
Klon IRAKp961A12133Q	CGCTTCACCG	CGCACTGGCG	GGTCCCCTG	CTGACCGCCG	GCGCCCCGGC
mRNS NPR1 Ensembl	CGCTTCACCG	CGCACTGGCG	GGTCCCCTG	CTGACCGCCG	GCGCCCCGGC
	901				950
Klon IRAKp961A12133Q	GCTGGGCTTC	GGTGTC AAGG	ACGAGTATGC	GCTGACCACC	CGCGCGGGGC
mRNS NPR1 Ensembl	GCTGGGCTTC	GGTGTC AAGG	ACGAGTATGC	GCTGACCACC	CGCGCGGGGC
	951				1000
Klon RAKp961A12133Q	CCAGCTACGC	CAAGCTGGGG	GACTTCGTGG	CGGCGCTGCA	CCGACGGCTG
mRNS NPR1 Ensembl	CCAGCTACGC	CAAGCTGGGG	GACTTCGTGG	CGGCGCTGCA	CCGACGGCTG
	1001				1050
Klon IRAKp961A12133Q	GGCTGGGAGC	GCCAAGCGCT	CATGCTCTAC	GCCTACCGGC	CGGGTGACGA
mRNS NPR1 Ensembl	GGCTGGGAGC	GCCAAGCGCT	CATGCTCTAC	GCCTACCGGC	CGGGTGACGA
	1051				1100
Klon IRAKp961A12133Q	AGAGCACTGC	TTCTTCCTCG	TGGAGGGGCT	GTTTCATGCGG	GTCCGCGACC
mRNS NPR1 Ensembl	AGAGCACTGC	TTCTTCCTCG	TGGAGGGGCT	GTTTCATGCGG	GTCCGCGACC
	1101				1150
Klon IRAKp961A12133Q	GCCTCAATAT	TACGGTGGAC	CACCTGGAGT	TCGCCGAGGA	CGACCTCAGC
mRNS NPR1 Ensembl	GCCTCAATAT	TACGGTGGAC	CACCTGGAGT	TCGCCGAGGA	CGACCTCAGC
	1151				1200
Klon IRAKp961A12133Q	CACTACACCA	GGCTGCTGCG	GACCATGCCG	CGCAAAGGCC	GAGTTATCTA
mRNS NPR1 Ensembl	CACTACACCA	GGCTGCTGCG	GACCATGCCG	CGCAAAGGCC	GAGTTATCTA
	1201				1250
Klon IRAKp961A12133Q	CATCTGCAGC	TCCCCTGATG	CCTTCAGAAC	CCTCATGCTC	CTGGCCCTGG
mRNS NPR1 Ensembl	CATCTGCAGC	TCCCCTGATG	CCTTCAGAAC	CCTCATGCTC	CTGGCCCTGG
	1251				1300
Klon IRAKp961A12133Q	AAGCTGGCTT	GTGTGGGGAG	GACTACGTTT	TCTTCCACCT	GGATATCTTT
mRNS NPR1 Ensembl	AAGCTGGCTT	GTGTGGGGAG	GACTACGTTT	TCTTCCACCT	GGATATCTTT
	1301				1350
Klon IRAKp961A12133Q	GGGCAAAGCC	TGCAAGGTGG	ACAGGGCCCT	GCTCCCCGCA	GGCCCTGGGA
mRNS NPR1 Ensembl	GGGCAAAGCC	TGCAAGGTGG	ACAGGGCCCT	GCTCCCCGCA	GGCCCTGGGA
	1351				1400
Klon IRAKp961A12133Q	GAGAGGGGAT	GGGCAGGATG	TCAGTGCCCG	CCAGGCCTTT	CAGGCTGCCA
mRNS NPR1 Ensembl	GAGAGGGGAT	GGGCAGGATG	TCAGTGCCCG	CCAGGCCTTT	CAGGCTGCCA

Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	1401	AAATCATTAC	ATATAAAGAC	CCAGATAATC	CCGAGTACTT	1450 GGAATTCCTG
		AAATCATTAC	ATATAAAGAC	CCAGATAATC	CCGAGTACTT	GGAATTCCTG
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	1451	AAGCAGTTAA	AACACCTGGC	CTATGAGCAG	TTCAACTTCA	1500 CCATGGAGGA
		AAGCAGTTAA	AACACCTGGC	CTATGAGCAG	TTCAACTTCA	CCATGGAGGA
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	1501	TGTCCTGGTG	AACACCATCC	CAGCATCCTT	CCACGACGGG	1550 CTCCTGCTCT
		TGGCCTGGTG	AACACCATCC	CAGCATCCTT	CCACGACGGG	CTCCTGCTCT
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	1551	ATATCCAGGC	AGTGACGGAG	ACTCTGGCAC	ATGGGGGAAC	1600 TGTTACTGAT
		ATATCCAGGC	AGTGACGGAG	ACTCTGGCAC	ATGGGGGAAC	TGTTACTGAT
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	1601	GGGGAGAACA	TCACTCAGCG	GATGTGGAAC	CGAAGCTTTC	1650 AAGGTGTGAC
		GGGGAGAACA	TCACTCAGCG	GATGTGGAAC	CGAAGCTTTC	AAGGTGTGAC
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	1651	AGGATACCTG	AAAATTGATA	GCAGTGGCGA	TCGGGAAACA	1700 GACTTCTCCC
		AGGATACCTG	AAAATTGATA	GCAGTGGCGA	TCGGGAAACA	GACTTCTCCC
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	1701	TCTGGGATAT	GGATCCCGAG	AATGGTGCCT	TCAGGGTTGT	1750 ACTGAACTAC
		TCTGGGATAT	GGATCCCGAG	AATGGTGCCT	TCAGGGTTGT	ACTGAACTAC
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	1751	AATGGGACTT	CCCAAGAGCT	GGTGGCTGTG	TCGGGGCGCA	1800 AACTGAACTG
		AATGGGACTT	CCCAAGAGCT	GGTGGCTGTG	TCGGGGCGCA	AACTGAACTG
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	1801	GCCCCTGGGG	TACCCTCCTC	CTGACATCCC	CAAATGTGGC	1850 TTTGACAACG
		GCCCCTGGGG	TACCCTCCTC	CTGACATCCC	CAAATGTGGC	TTTGACAACG
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	1851	AAGACCCAGC	ATGCAACCAA	GATCACCTTT	CCACCCCTGGA	1900 GGTGTCTGGCT
		AAGACCCAGC	ATGCAACCAA	GATCACCTTT	CCACCCCTGGA	GGTGTCTGGCT
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	1901	TTGGTGGGCA	GCCTCTCCTT	GCTCGGCATT	CTGATTGTCT	1950 CCTTCTTCAT
		TTGGTGGGCA	GCCTCTCCTT	GCTCGGCATT	CTGATTGTCT	CCTTCTTCAT
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	1951	ATACAGGAAG	ATGCAGCTGG	AGAAGGAACT	GGCCTCGGAG	2000 CTGTGGCGGG
		ATACAGGAAG	ATGCAGCTGG	AGAAGGAACT	GGCCTCGGAG	CTGTGGCGGG
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	2001	TGCGCTGGGA	GGACGTTGAG	CCCAGTAGCC	TTGAGAGGCA	2050 CCTGCGGAGT
		TGCGCTGGGA	GGACGTTGAG	CCCAGTAGCC	TTGAGAGGCA	CCTGCGGAGT
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	2051	GCAGGCAGCC	GGCTGACCCT	GAGCGGGAGA	GGCTCCAATT	2100 ACGGCTCCCT
		GCAGGCAGCC	GGCTGACCCT	GAGCGGGAGA	GGCTCCAATT	ACGGCTCCCT
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	2101	GCTAACCACA	GAGGGCCAGT	TCCAAGTCTT	TGCCAAGACA	2150 GCATATTATA
		GCTAACCACA	GAGGGCCAGT	TCCAAGTCTT	TGCCAAGACA	GCATATTATA

Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	2151	AGGGCAACCT	CGTGGCTGTG	AAACGTGTGA	ACCGTAAACG	2200	CATTGAGCTG
		AGGGCAACCT	CGTGGCTGTG	AAACGTGTGA	ACCGTAAACG		CATTGAGCTG
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	2201	ACACGAAAAG	TCCTGTTTGA	ACTGAAGCAT	ATGCGGGATG	2250	TGCAGAATGA
		ACACGAAAAG	TCCTGTTTGA	ACTGAAGCAT	ATGCGGGATG		TGCAGAATGA
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	2251	ACACCTGACC	AGGTTTGTGG	GAGCCTGCAC	CGACCCCCCC	2300	AATATCTGCA
		ACACCTGACC	AGGTTTGTGG	GAGCCTGCAC	CGACCCCCCC		AATATCTGCA
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	2301	TCCTCACAGA	GTACTGTCCC	CGTGGGAGCC	TGCAGGACAT	2350	TCTGGAGAAT
		TCCTCACAGA	GTACTGTCCC	CGTGGGAGCC	TGCAGGACAT		TCTGGAGAAT
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	2351	GAGAGCATCA	CCCTGGACTG	GATGTTCCGG	TACTCACTCA	2400	CCAATGACAT
		GAGAGCATCA	CCCTGGACTG	GATGTTCCGG	TACTCACTCA		CCAATGACAT
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	2401	CGTCAAGGGC	ATGCTGTTTC	TACACAATGG	GGCTATCTGT	2450	TCCCATGGGA
		CGTCAAGGGC	ATGCTGTTTC	TACACAATGG	GGCTATCTGT		TCCCATGGGA
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	2451	ACCTCAAAGTC	ATCCAACTGC	GTGGTAGATG	GGCGCTTTGT	2500	GCTCAAGATC
		ACCTCAAAGTC	ATCCAACTGC	GTGGTAGATG	GGCGCTTTGT		GCTCAAGATC
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	2501	ACCGACTATG	GGCTGGAGAG	CTTCAGGGAC	CTGGACCCAG	2550	AGCAAGGACA
		ACCGACTATG	GGCTGGAGAG	CTTCAGGGAC	CTGGACCCAG		AGCAAGGACA
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	2551	CACCGTTTAT	GCCAAAAAGC	TGTGGACGGC	CCCTGAGCTC	2600	CTGCGAATGG
		CACCGTTTAT	GCCAAAAAGC	TGTGGACGGC	CCCTGAGCTC		CTGCGAATGG
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	2601	CTTCACCCCC	TGTGCGGGGC	TCCCAGGCTG	GTGACGTATA	2650	CAGCTTTGGG
		CTTCACCCCC	TGTGCGGGGC	TCCCAGGCTG	GTGACGTATA		CAGCTTTGGG
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	2651	ATCATCCTTC	AGGAGATTGC	CCTGAGGAGT	GGGGTCTTCC	2700	ACGTGGAAGG
		ATCATCCTTC	AGGAGATTGC	CCTGAGGAGT	GGGGTCTTCC		ACGTGGAAGG
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	2701	TTTGGACCTG	AGCCCCAAAG	AGATCATCGA	GCGGGTGACT	2750	CGGGGTGAGC
		TTTGGACCTG	AGCCCCAAAG	AGATCATCGA	GCGGGTGACT		CGGGGTGAGC
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	2751	AGCCCCCCTT	CCGGCCCTCC	CTGGCCCTGC	AGAGTCACCT	2800	GGAGGAGTTG
		AGCCCCCCTT	CCGGCCCTCC	CTGGCCCTGC	AGAGTCACCT		GGAGGAGTTG
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	2801	GGGCTGCTCA	TGCAGCGGTG	CTGGGCTGAG	GACCCACAGG	2850	AGAGGCCACC
		GGGCTGCTCA	TGCAGCGGTG	CTGGGCTGAG	GACCCACAGG		AGAGGCCACC
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	2851	ATTCCAGCAG	ATCCGCCTGA	CGTTGCGCAA	ATTTAACAGG	2900	GAGAACAGCA
		ATTCCAGCAG	ATCCGCCTGA	CGTTGCGCAA	ATTTAACAGG		GAGAACAGCA

Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	2901	GCAACATCCT	GGACAACCTG	CTGTCCCGCA	TGGAGCAGTA	CGCGAACAAT
		GCAACATCCT	GGACAACCTG	CTGTCCCGCA	TGGAGCAGTA	CGCGAACAAT
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	2951	CTGGAGGAAC	TGGTGGAGGA	GCGGACCCAG	GCATACCTGG	AGGAGAAGCG
		CTGGAGGAAC	TGGTGGAGGA	GCGGACCCAG	GCATACCTGG	AGGAGAAGCG
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	3001	CAAGGCTGAG	GCCCTGCTCT	ACCAGATCCT	GCCTCACTCA	GTGGCTGAGC
		CAAGGCTGAG	GCCCTGCTCT	ACCAGATCCT	GCCTCACTCA	GTGGCTGAGC
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	3051	AGCTGAAGCG	TGGGGAGACG	GTGCAGGCCG	AAGCCTTTGA	CAGTGTTACC
		AGCTGAAGCG	TGGGGAGACG	GTGCAGGCCG	AAGCCTTTGA	CAGTGTTACC
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	3101	ATCTACTTCA	GTGACATTGT	GGGTTTCACA	GCGCTGTCGG	CGGAGAGCAC
		ATCTACTTCA	GTGACATTGT	GGGTTTCACA	GCGCTGTCGG	CGGAGAGCAC
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	3151	GCCCATGCAG	GTGGTGACCC	TGCTCAATGA	CCTGTACACT	TGCTTTGATG
		ACCCATGCAG	GTGGTGACCC	TGCTCAATGA	CCTGTACACT	TGCTTTGATG
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	3201	CTGTCATAGA	CAACTTTGAT	GTGTACAAGG	TGGAGACAAT	TGGCGATGCC
		CTGTCATAGA	CAACTTTGAT	GTGTACAAGG	TGGAGACAAT	TGGCGATGCC
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	3251	TACATGGTGG	TGTCAGGGCT	CCCTGTGCGG	AACGGGCGGC	TACACGCCTG
		TACATGGTGG	TGTCAGGGCT	CCCTGTGCGG	AACGGGCGGC	TACACGCCTG
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	3301	CGAGGTAGCC	CGCATGGCCC	TGGCACTGCT	GGATGCTGTG	CGCTCCTTCC
		CGAGGTAGCC	CGCATGGCCC	TGGCACTGCT	GGATGCTGTG	CGCTCCTTCC
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	3351	GAATCCGCCA	CCGGCCCCAG	GAGCAGCTGC	GCTTGCGCAT	TGGCATCCAC
		GAATCCGCCA	CCGGCCCCAG	GAGCAGCTGC	GCTTGCGCAT	TGGCATCCAC
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	3401	ACAGGACCTG	TGTGTGCTGG	AGTGGTGGGA	CTGAAGATGC	CCCGTTACTG
		ACAGGACCTG	TGTGTGCTGG	AGTGGTGGGA	CTGAAGATGC	CCCGTTACTG
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	3451	TCTCTTTGGG	GATACAGTCA	ACACAGCCTC	AAGAATGGAG	TCTAATGGGG
		TCTCTTTGGG	GATACAGTCA	ACACAGCCTC	AAGAATGGAG	TCTAATGGGG
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	3501	AAGCCCTGAA	GATCCACTTG	TCTTCTGAGA	CCAAGGCTGT	CCTGGAGGAG
		AAGCCCTGAA	GATCCACTTG	TCTTCTGAGA	CCAAGGCTGT	CCTGGAGGAG
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	3551	TTTGGTGGTT	TCGAGCTGGA	GCTTCGAGGG	GATGTAGAAA	TGAAGGGCAA
		TTTGGTGGTT	TCGAGCTGGA	GCTTCGAGGG	GATGTAGAAA	TGAAGGGCAA
Klon IRAKp961A12133Q mRNS NPR1 Ensembl	3601	AGGCAAGGTT	CGGACCTACT	GGCTCCTTGG	GGAGAGGGGG	AGTAGCACCC
		AGGCAAGGTT	CGGACCTACT	GGCTCCTTGG	GGAGAGGGGG	AGTAGCACCC

	3651				3700
Klon IRAKp961A12133Q	GAGGCTGACC	TGCCTCCTCT	CCTATCCCTC	CACACCTCCC	CTACCCTGTG
mRNS NPR1 Ensembl	GAGGCTGACC	TGCCTCCTCT	CCTATCCCTC	CACACCTCCC	.TACCCTGTG
	3701				3750
Klon IRAKp961A12133Q	CCAGAAGCAA	CAGAGGTGCC	AGGCCTCAGC	CTCACCACACA	GCAGCCCCAT
mRNS NPR1 Ensembl	CCAGAAGCAA	CAGAGGTGCC	AGGCCTCAGC	CTCACCACACA	GCAGCCCCAT
	3751				3800
Klon IRAKp961A12133Q	CGCCAAAAGGA	TGGAAGTAAT	TTGAATAGCT	CAGGTGTGCT	TACCCCAAGTG
mRNS NPR1 Ensembl	CGCCAAAAGGA	TGGAAGTAAT	TTGAATAGCT	CAGGTGTGCT	GACCCCAAGTG
	3801				3850
Klon IRAKp961A12133Q	AAGACACCAG	ATAGGACCTC	TGAGAGGGGA	CTGGCATGGG	GGGATCTCAG
mRNS NPR1 Ensembl	AAGACACCAG	ATAGGACCTC	TGAGAGGGGA	CTGGCATGGG	GGGATCTCAG
	3851				3900
Klon IRAKp961A12133Q	AGCTTACAGG	CTGAGCCAAG	CCCACGGCCA	TGCACAGGGA	CACTCACACA
mRNS NPR1 Ensembl	AGCTTACAGG	CTGAGCCAAG	CCCACGGCCA	TGCACAGGGA	CACTCACACA
	3901				3950
Klon IRAKp961A12133Q	GGCACACGCA	CCTGCTCTCC	ACCTGGACTC	AGGCCGGGCT	GGGCTGTGGA
mRNS NPR1 Ensembl	GGCACACGCA	CCTGCTCTCC	ACCTGGACTC	AGGCCGGGCT	GGGCTGTGGA
	3951				4000
Klon IRAKp961A12133Q	TTCTTGATCC	CCTCCCCTCC	CCATGCTCTC	CTCCCTCAGC	CTTGCTACCC
mRNS NPR1 Ensembl	TTCTTGATCC	CCTCCCCTCC	CCATGCTCTC	CTCCCTCAGC	CTTGCTACCC
	4001				4050
Klon IRAKp961A12133Q	TGTGACTTAC	TGGGAGGAGA	AAGAGTCACC	TGAAGGGGAA	CATGAAAAGA
mRNS NPR1 Ensembl	TGTGACTTAC	TGGGAGGAGA	AAGAGTCACC	TGAAGGGGAA	CATGAAAAGA
	4051				4100
Klon IRAKp961A12133Q	GACTAGGTGA	AGAGAGGGCA	GGGGAGCCCA	CATCTGGGGC	TGGCCCACAA
mRNS NPR1 Ensembl	GACTAGGTGA	AGAGAGGGCA	GGGGAGCCCA	CATCTGGGGC	TGGCCCACAA
	4101				4150
Klon IRAKp961A12133Q	TACCTGCTCC	CCCGACCCCC	TCCACCCAGC	AGTAGACACA	GTGCACAGGG
mRNS NPR1 Ensembl	TACCTGCTCC	CCCGACCCCC	TCCACCCAGC	AGTAGACACA	GTGCACAGGG
	4151				4200
Klon IRAKp961A12133Q	GAGAAGAGGG	GTGGCGCAGA	AGGGTTGGGG	GCCTGTATGC	CTTGCTTCTA
mRNS NPR1 Ensembl	GAGAAGAGGG	GTGGCGCAGA	AGGGTTGGGG	GCCTGTATGC	CTTGCTTCTA
	4201				4248
Klon IRAKp961A12133Q	CCATGAGCAG	AGACAATTAA	AATCTTTATT	CCAAAAAAAA	AAAAAAAA
mRNS NPR1 Ensembl	CCATGAGCAG	AGACAATTAA	AATCTTTATT	CC~~~~~	



Translationsstartpunkt



Stopcodon

M. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon IRAMp995O172Q2 mit der mRNS-Sequenz von OFD1 aus der Ensembl-Datenbank



	101		150
Klon IRAMp995O172Q	~~~~~	~~~~~	~~~~~
mRNS OFD1 Ensembl	TGCCTCAGAA	CCGCGAAGAA	AGGAAGCTCG
	151		200
Klon IRAMp995O172Q	~~~GGGAGTG	CGAGGCAGAG	AACGTTTCAGC
mRNS OFD1 Ensembl	GTTGGGAGTG	CGAGGCAGAG	AACGTTTCAGC
	201		250
Klon IRAMp995O172Q	CTCGGGACAG	AGGCAGGGTT	CTGAGGGCAG
mRNS OFD1 Ensembl	CTCGGGACAG	AGGCAGGGTT	CTGAGGGCAG
	251		300
Klon IRAMp995O172Q	CCCACCGCCC	GGGCTGGGCA	CTAAACTCGG
mRNS OFD1 Ensembl	CCCACCGCCC	GGGCTGGGCA	CTAAACTCGG
	301		350
Klon IRAMp995O172Q	GCGGGCTCCG	GAGGGAGCTG	ACGCCTGATG
mRNS OFD1 Ensembl	GCGGGCTCCG	GAGGGAGCTG	ACGCCTGATG
	351		400
Klon IRAMp995O172Q	TACCGTGGCT	GATGTGTTGA	GTCAAGATGA
mRNS OFD1 Ensembl	TACCGTGGCT	GATGTGTTGA	GTCAAGATGA
	401		450
Klon IRAMp995O172Q	AGACGTTTAA	GGATCGGGGT	ATACTGGATA
mRNS OFD1 Ensembl	AGACGTTTAA	GGATCGGGGT	ATACTGGATA
	451		500
Klon IRAMp995O172Q	AACCAGCTAA	TTCATGAGTT	GATGCACCCT
mRNS OFD1 Ensembl	AACCAGCTAA	TTCATGAGTT	GATGCACCCT
	501		550
Klon IRAMp995O172Q	GCCTCGGTCC	ATTTTCAGTAG	AAGGGAGCTC
mRNS OFD1 Ensembl	GCCTCGGTCC	ATTTTCAGTAG	AAGGGAGCTC
	551		600
Klon IRAMp995O172Q	ACTCTTTAGT	GGCAGATCAC	TTACAAAGAT
mRNS OFD1 Ensembl	ACTCTTTAGT	GGCAGATCAC	TTACAAAGAT
	601		650
Klon IRAMp995O172Q	TCTGTTTTCT	TTCCAGAAAG	TGGTTTGGCA
mRNS OFD1 Ensembl	TCTGTTTTCT	TTCCAGAAAG	TGGTTTGGCA
	651		700
Klon IRAMp995O172Q	GCAGGATCTA	TTACAACTCA	TTAAAATCAA
mRNS OFD1 Ensembl	GCAGGATCTA	TTACAACTCA	TTAAAATCAA
	701		750
Klon IRAMp995O172Q	AATCACTGGT	TTCAGGATCT	GATAAAGAAA
mRNS OFD1 Ensembl	AATCACTGGT	TTCAGGATCT	GATAAAGAAA
	751		800
Klon IRAMp995O172Q	CATTTTTTAA	AAGAATTGGC	AGAATATCAT
mRNS OFD1 Ensembl	CATTTTTTAA	AAGAATTGGC	AGAATATCAT

	801				850
Klon IRAMp9950172Q	TATGGAAACT	CAGACAAGTT	CGACATTTAA	CAGAGATTCT	CTGGCTGAGA
mRNS OFD1 Ensembl	TATGGAAACT	CAGACAAGTT	CGACATTTAA	CAGAGATTCT	CTGGCTGAGA
	851				900
Klon IRAMp9950172Q	AGCTTCAGCT	TATTGATGAT	CAGTTTGCAG	ATGCTTACCC	TCAGCGTATC
mRNS OFD1 Ensembl	AGCTTCAGCT	TATTGATGAT	CAGTTTGCAG	ATGCTTACCC	TCAGCGTATC
	901				950
Klon IRAMp9950172Q	AAGTTCGAAT	CTTTAGAAAT	AAAGCTAAAT	GAGTATAAGA	GAGAAATAGA
mRNS OFD1 Ensembl	AAGTTCGAAT	CTTTAGAAAT	AAAGCTAAAT	GAGTATAAGA	GAGAAATAGA
	951				1000
Klon IRAMp9950172Q	AGAGCAACTT	CGGGCAGAAA	TGTGTCAAAA	GTTGAAGTTT	TTTAAAGATA
mRNS OFD1 Ensembl	AGAGCAACTT	CGGGCAGAAA	TGTGTCAAAA	GTTGAAGTTT	TTTAAAGATA
	1001				1050
Klon IRAMp9950172Q	CCGAGATAGC	AAAAATTAAA	ATGGAAGCAA	AAAAAAAGTA	TGAAAAGGAG
mRNS OFD1 Ensembl	CCGAGATAGC	AAAAATTAAA	ATGGAAGCAA	AAAAAAAGTA	TGAAAAGGAG
	1051				1100
Klon IRAMp9950172Q	TTAACCATGT	TCCAGAATGA	TTTTGAAAAA	GCTTGTCAAG	CAAAATCTGA
mRNS OFD1 Ensembl	TTAACCATGT	TCCAGAATGA	TTTTGAAAAA	GCTTGTCAAG	CAAAATCTGA
	1101				1150
Klon IRAMp9950172Q	AGCTCTCGTT	CTTCGGGAAA	AGAGTACCCT	TGAAAAGAATT	CACAAGCACC
mRNS OFD1 Ensembl	AGCTCTCGTT	CTTCGGGAAA	AGAGTACCCT	TGAAAAGAATT	CACAAGCACC
	1151				1200
Klon IRAMp9950172Q	AAGAGATTGA	AACAAAAGAA	ATTTATGCTC	AAAGGCAACT	TTTACTAAAA
mRNS OFD1 Ensembl	AAGAGATTGA	AACAAAAGAA	ATTTATGCTC	AAAGGCAACT	TTTACTAAAA
	1201				1250
Klon IRAMp9950172Q	GATATGGATT	TGCTAAGAGG	AAGAGAAGCA	GAGCTGAAGC	AAAGAGTTGA
mRNS OFD1 Ensembl	GATATGGATT	TGCTAAGAGG	AAGAGAAGCA	GAGCTGAAGC	AAAGAGTTGA
	1251				1300
Klon IRAMp9950172Q	AGCTTTTGAA	TTG.....
mRNS OFD1 Ensembl	AGCTTTTGAA	TTGAACCAGA	AGCTCCAGGA	AGAAAAACAT	AAAAGCATAA
	1301				1350
Klon IRAMp9950172Q
mRNS OFD1 Ensembl	CTGAGGCACT	TAGGAGACAG	GAGCAGAATA	TAAAGAGTTT	TGAGGAGACC
	1351				1400
Klon IRAMp9950172QTATCAAC	TTGAACTGAA
mRNS OFD1 Ensembl	TATGACCGAA	AGCTCAAGAA	TGAACCTCTA	AAGTATCAAC	TTGAACTGAA
	1401				1450
Klon IRAMp9950172Q	GGATGACTAC	ATCATTAGAA	CTAATCGACT	GATTGAAGAT	GAAAGGAAGA
mRNS OFD1 Ensembl	GGATGACTAC	ATCATTAGAA	CTAATCGACT	GATTGAAGAT	GAAAGGAAGA
	1451				1500
Klon IRAMp9950172Q	ATAAAGAAAA	AGCTGTTCAT	TTGCAAGAGG	AGCTCATAGC	TATTAATTCA
mRNS OFD1 Ensembl	ATAAAGAAAA	AGCTGTTCAT	TTGCAAGAGG	AGCTCATAGC	TATTAATTCA
	1501				1550
Klon IRAMp9950172Q	AAAAAGGAGG	AACTCAATCA	ATCTGTAAAT	CGTGTGAAAG	AACTTGAGCT
mRNS OFD1 Ensembl	AAAAAGGAGG	AACTCAATCA	ATCTGTAAAT	CGTGTGAAAG	AACTTGAGCT

	1551				1600
Klon IRAMp9950172Q	TGAATTAGAG	TCTGTCAAAG	CCCAGTCTTT	GGCAATAACA	AAACAAAACC
mRNS OFD1 Ensembl	TGAATTAGAG	TCTGTCAAAG	CCCAGTCTTT	GGCAATAACA	AAACAAAACC
	1601				1650
Klon IRAMp9950172Q	ATATGCTGAA	TGAAAAGGTT	AAAGAGATGA	GTGATTATTC	ACTACTAAAA
mRNS OFD1 Ensembl	ATATGCTGAA	TGAAAAGGTT	AAAGAGATGA	GTGATTATTC	ACTACTAAAA
	1651				1700
Klon IRAMp9950172Q	GAAGAGAAAC	TGGAGCTTCT	GGCACAAAAT	AAATTACTTA	AACAACAAC
mRNS OFD1 Ensembl	GAAGAGAAAC	TGGAGCTTCT	GGCACAAAAT	AAATTACTTA	AACAACAAC
	1701				1750
Klon IRAMp9950172Q	GGAAGAGAGT	AGAAATGAAA	ACCTGCGTCT	CCTAAACCGC	CTAGCTCAGC
mRNS OFD1 Ensembl	GGAAGAGAGT	AGAAATGAAA	ACCTGCGTCT	CCTAAACCGC	CTAGCTCAGC
	1751				1800
Klon IRAMp9950172Q	CGGCTCCTGA	ACTTGCAAGT	TTTCAGAAAAG	AACTACGGAA	AGCCGAAAAG
mRNS OFD1 Ensembl	CGGCTCCTGA	ACTTGCAAGT	TTTCAGAAAAG	AACTACGGAA	AGCCGAAAAG
	1801				1850
Klon IRAMp9950172Q	GCTATAGTGG	TTGAGCATGA	GGAGTTCGAA	AGCTGCAGGC	AAGCTCTGCA
mRNS OFD1 Ensembl	GCTATAGTGG	TTGAGCATGA	GGAGTTCGAA	AGCTGCAGGC	AAGCTCTGCA
	1851				1900
Klon IRAMp9950172Q	CAAACAAC	CAAGACGAAA	TTGAGCATTC	TGCACAGCTG	AAGGCCCAGA
mRNS OFD1 Ensembl	CAAACAAC	CAAGACGAAA	TTGAGCATTC	TGCACAGCTG	AAGGCCCAGA
	1901				1950
Klon IRAMp9950172Q	TTCTAGGTGA	CAAAGCTTCT	GTAAAGAGTT	TAACTACTCA	GGTTGCCGAT
mRNS OFD1 Ensembl	TTCTAGGTGA	CAAAGCTTCT	GTAAAGAGTT	TAACTACTCA	GGTTGCCGAT
	1951				2000
Klon IRAMp9950172Q	TTAAAATTGC	AACTGAAGCA	AACTCAGACA	GCCCTAGAGA	ATGAAGTGTA
mRNS OFD1 Ensembl	TTAAAATTGC	AACTGAAGCA	AACTCAGACA	GCCCTAGAGA	ATGAAGTGTA
	2001				2050
Klon IRAMp9950172Q	CTGCAATCCA	AAGCAGTCTG	TGATCGATCG	TTCTGTCAAT	GGATTAATAA
mRNS OFD1 Ensembl	CTGCAATCCA	AAGCAGTCTG	TGATCGATCG	TTCTGTCAAT	GGATTAATAA
	2051				2100
Klon IRAMp9950172Q	ATGGCAATGT	GGTGCCTTGC	AATGGTGAGA	TAAGTGGGGA	TTTCTTGAAC
mRNS OFD1 Ensembl	ATGGCAATGT	GGTGCCTTGC	AATGGTGAGA	TAAGTGGGGA	TTTCTTGAAC
	2101				2150
Klon IRAMp9950172Q	AATCCTTTTA	AACAGGAAAA	CGTTCTAGCA	CGTATGGTTG	CATCAAGGAT
.mRNS OFD1 Ensembl	AATCCTTTTA	AACAGGAAAA	CGTTCTAGCA	CGTATGGTTG	CATCAAGGAT
	2151				2200
Klon IRAMp9950172Q	CACAAATTAT	CCAACTGCAT	GGGTGGAGGG	TAGTTCCCCT	GATTCTGACC
mRNS OFD1 Ensembl	CACAAATTAT	CCAACTGCAT	GGGTGGAGGG	TAGTTCCCCT	GATTCTGACC
	2201				2250
Klon IRAMp9950172Q	TTGAGTTTGT	AGCCAATACT	AAGGCAAGGG	TCAAAGAGCT	TCAGCAAGAG
mRNS OFD1 Ensembl	TTGAGTTTGT	AGCCAATACT	AAGGCAAGGG	TCAAAGAGCT	TCAGCAAGAG
	2251				2300
Klon IRAMp9950172Q	GCCGAACGCT	TGGAAGAGGC	TTTCAGAAAGT	TACCATCGGA	GAGTCATTAA
mRNS OFD1 Ensembl	GCCGAACGCT	TGGAAGAGGC	TTTCAGAAAGT	TACCATCGGA	GAGTCATTAA

	2301				2350
Klon IRAMp9950172Q	AAACTCTGCC	AAAAGCCCAC	TAGCAGCAAA	GAGCCCACCA	TCTCTGCACT
mRNS OFD1 Ensembl	AAACTCTGCC	AAAAGCCCAC	TAGCAGCAAA	GAGCCCACCA	TCTCTGCACT
	2351				2400
Klon IRAMp9950172Q	TGCTGGAAGC	CTTCAAAAAC	ATTACTTCCA	GTTCCCCGGA	AAGACATATT
mRNS OFD1 Ensembl	TGCTGGAAGC	CTTCAAAAAC	ATTACTTCCA	GTTCCCCGGA	AAGACATATT
	2401				2450
Klon IRAMp9950172Q	TTTGGAGAGG	ACAGAGTTGT	CTCTGAGCAG	CCTCAAGTGG	GCACACTTGA
mRNS OFD1 Ensembl	TTTGGAGAGG	ACAGAGTTGT	CTCTGAGCAG	CCTCAAGTGG	GCACACTTGA
	2451				2500
Klon IRAMp9950172Q	AGAAAGGAAT	GACGTCGTGG	AAGCACTGAC	AGGCAGTGCA	GCCTCGAGGC
mRNS OFD1 Ensembl	AGAAAGGAAT	GACGTCGTGG	AAGCACTGAC	AGGCAGTGCA	GCCTCGAGGC
	2501				2550
Klon IRAMp9950172Q	TCCGCGGGGG	CACTTCCTCC	AGACGCCTCT	CTTCCACACC	CCTTCCAAAA
mRNS OFD1 Ensembl	TCCGCGGGGG	CACTTCCTCC	AGACGCCTCT	CTTCCACACC	CCTTCCAAAA
	2551				2600
Klon IRAMp9950172Q	GCAAAAAGAA	GCCTCGAAAG	TGAAATGTAT	CTGGAAGGTC	TGGGCAGATC
mRNS OFD1 Ensembl	GCAAAAAGAA	GCCTCGAAAG	TGAAATGTAT	CTGGAAGGTC	TGGGCAGATC
	2601				2650
Klon IRAMp9950172Q	ACACATTGCT	TCCCCCAGTC	CTTGTCCTGA	CAGAATGCCC	CTACCATCAC
mRNS OFD1 Ensembl	ACACATTGCT	TCCCCCAGTC	CTTGTCCTGA	CAGAATGCCC	CTACCATCAC
	2651				2700
Klon IRAMp9950172Q	CCACTGAGTC	TAGGCACAGC	CTCTCCATCC	CTCCTGTCTC	CAGCCCTCCG
mRNS OFD1 Ensembl	CCACTGAGTC	TAGGCACAGC	CTCTCCATCC	CTCCTGTCTC	CAGCCCTCCG
	2701				2750
Klon IRAMp9950172Q	GAGCAGAAAG	TGGGTCTTTA	TCGAAGACAA	ACTGAACTTC	AAGACAAAAG
mRNS OFD1 Ensembl	GAGCAGAAAG	TGGGTCTTTA	TCGAAGACAA	ACTGAACTTC	AAGACAAAAG
	2751				2800
Klon IRAMp9950172Q	TGAATTTTCA	GATGTGGACA	AGCTAGCTTT	TAAGGATAAT	GAGGAGTTTG
mRNS OFD1 Ensembl	TGAATTTTCA	GATGTGGACA	AGCTAGCTTT	TAAGGATAAT	GAGGAGTTTG
	2801				2850
Klon IRAMp9950172Q	AATCATCTTT	TGAATCTGCA	GGGAACATGC	CAAGGCAGTT	GGAAATGGGC
mRNS OFD1 Ensembl	AATCATCTTT	TGAATCTGCA	GGGAACATGC	CAAGGCAGTT	GGAAATGGGC
	2851				2900
Klon IRAMp9950172Q	GGGCTTTCTC	CTGCCGGGGA	TATGTCTCAT	GTGGACGCTG	CTGCAGCTGC
mRNS OFD1 Ensembl	GGGCTTTCTC	CTGCCGGGGA	TATGTCTCAT	GTGGACGCTG	CTGCAGCTGC
	2901				2950
Klon IRAMp9950172Q	TGTGCCCCCTC	TCATATCAGC	ACCCAAGTGT	AGATCAGAAA	CAAATTGAAG
mRNS OFD1 Ensembl	TGTGCCCCCTC	TCATATCAGC	ACCCAAGTGT	AGATCAGAAA	CAAATTGAAG
	2951				3000
Klon IRAMp9950172Q	AACAAAAGGA	AGAAGAAAAA	ATACGGGAAC	AGCAAGTGAA	AGAACGAAGG
mRNS OFD1 Ensembl	AACAAAAGGA	AGAAGAAAAA	ATACGGGAAC	AGCAAGTGAA	AGAACGAAGG
	3001				3050
Klon IRAMp9950172Q	CAGAGAGAAG	AAAGAAGGCA	GAGTAACCTA	CAAGAAGTTT	TAGAAAGGGA
mRNS OFD1 Ensembl	CAGAGAGAAG	AAAGAAGGCA	GAGTAACCTA	CAAGAAGTTT	TAGAAAGGGA

	3051				3100
Klon IRAMp9950172Q	ACGAAGAGAA	CTAGAAAAAC	TGTATCAGGA	AAGGAAGATG	ATTGAAGAAT
mRNS OFD1 Ensembl	ACGAAGAGAA	CTAGAAAAAC	TGTATCAGGA	AAGGAAGATG	ATTGAAGAAT
	3101				3150
Klon IRAMp9950172Q	CACTGAAGAT	TAAAATAAAA	AAGGAATTAG	AAATGGAAAA	TGAATTAGAA
mRNS OFD1 Ensembl	CACTGAAGAT	TAAAATAAAA	AAGGAATTAG	AAATGGAAAA	TGAATTAGAA
	3151				3200
Klon IRAMp9950172Q	ATGAGTAATC	AAGAAATAAA	AGACAAATCT	GCTCACAGTG	AAAAATCCTTT
mRNS OFD1 Ensembl	ATGAGTAATC	AAGAAATAAA	AGACAAATCT	GCTCACAGTG	AAAAATCCTTT
	3201				3250
Klon IRAMp9950172Q	AGAGAAATAC	ATGAAAATCA	TCCAGCAGGA	GCAAGACCAG	GAGTCGGCAG
mRNS OFD1 Ensembl	AGAGAAATAC	ATGAAAATCA	TCCAGCAGGA	GCAAGACCAG	GAGTCGGCAG
	3251				3300
Klon IRAMp9950172Q	ATAAGAGCTC	AAAAAAGATG	GTCCAAGAAG	GCTCCCTAGT	GGACACGCTG
mRNS OFD1 Ensembl	ATAAGAGCTC	AAAAAAGATG	GTCCAAGAAG	GCTCCCTAGT	GGACACGCTG
	3301				3350
Klon IRAMp9950172Q	CAATCTAGTG	ACAAAGTCGA	AAGTTTAACA	GGCTTTTCTC	ATGAAGAACT
mRNS OFD1 Ensembl	CAATCTAGTG	ACAAAGTCGA	AAGTTTAACA	GGCTTTTCTC	ATGAAGAACT
	3351				3400
Klon IRAMp9950172Q	AGACGACTCT	TGGTAA [■] CCAT	GTTTGCTGCC	CAGCTTCTAA	CTTACATACC
mRNS OFD1 Ensembl	AGACGACTCT	TGGTAA [■] CCAT	GTTTGCTGCC	CAGCTTCTAA	CTTACATACC
	3401				3450
Klon IRAMp9950172Q	GTGAGAAGTT	ACGTAACATT	TACTCCTTTG	TAAATGTTTC	CCTATCATCA
mRNS OFD1 Ensembl	GTGAGAAGTT	ACGTAACATT	TACTCCTTTG	TAAATGTTTC	CCTATCATCA
	3451				3500
Klon IRAMp9950172Q	GACAAAACCTC	AATAAAAAATG	TGTGTAATCC	AATGTGGGTT	TTTTTTTCCA
mRNS OFD1 Ensembl	GACAAAACCTC	AATAAAAAATG	TGTGTAATCC	AATGTGGGTT	TTTTTTTCCA
	3501				3550
Klon IRAMp9950172Q	TAATTAATTT	TGATACCATA	GTGTGTGAAC	CAAGAATAAT	CTAGTCACGT
mRNS OFD1 Ensembl	TAATTAATTT	TGATACCATA	GTGTGTGAAC	CAAGAATAAT	CTAGTCACGT
	3551				3600
Klon IRAMp9950172Q	GAAACCTCTT	CTCCAGTCA~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
mRNS OFD1 Ensembl	GAAACCTCTT	CTCCAGTCAT	AGTATTTCTC	ATTCATTATA	ATAAAAGTAA

 Translationsstartpunkt
  Stopcodon



N. Vergleich der cDNS-Sequenz von Klon IRAUp969G0689D mit der mRNS-Sequenz von UMOD aus der Ensembl-Datenbank

	1				50
Klon IRAUp969G0689D	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
mRNS UMOD Ensembl	AGACTAACTC	TACCTTTCTG	GCTTCAGGAC	ACCAGACATC	AGAGACAGAG
	51				100
Klon IRAUp969G0689D	~~~~~	~~~~~GACTAA	CTCTACCTTT	CTGGCTTCAG	GTGCTATCTA
mRNS UMOD Ensembl	AGAAAAATTC	AAAGGGCCAA	CCCGTCTTTC	CTTTGGGCAG	GTGCTATCTA
	101				150
Klon IRAUp969G0689D	GACCTGAAGT	AGCGGGAAGA	GCAGAAAGGA	TGGGGCAGCC	ATCTCTGACT
mRNS UMOD Ensembl	GACCTGAAGT	AGCGGGAAGA	GCAGAAAGGA	TGGGGCAGCC	ATCTCTGACT
	151				200
Klon IRAUp969G0689D	TGGATGCTGA	TGGTGGTGGT	GGCCTCTTGG	TTCATCACAA	CTGCAGCCAC
mRNS UMOD Ensembl	TGGATGCTGA	TGGTGGTGGT	GGCCTCTTGG	TTCATCACAA	CTGCAGCCAC
	201				250
Klon IRAUp969G0689D	TGACACCTCA	GAAGCAAGAT	GGTGCTCTGA	ATGTCACAGC	AATGCCACCT
mRNS UMOD Ensembl	TGACACCTCA	GAAGCAAGAT	GGTGCTCTGA	ATGTCACAGC	AATGCCACCT
	251				300
Klon IRAUp969G0689D	GCACGGAGGA	TGAGGCCGTT	ACGACGTGCA	CCTGTCAGGA	GGGCTTCACC
mRNS UMOD Ensembl	GCACGGAGGA	TGAGGCCGTT	ACGACGTGCA	CCTGTCAGGA	GGGCTTCACC
	301				350
Klon IRAUp969G0689D	GGCGATGGCC	TGACCTGCGT	GGACCTGGAT	GAGTGCGCCA	TTCCTGGAGC
mRNS UMOD Ensembl	GGCGATGGCC	TGACCTGCGT	GGACCTGGAT	GAGTGCGCCA	TTCCTGGAGC
	351				400
Klon IRAUp969G0689D	TCACAACTGC	TCCGCCAACA	GCAGCTGCGT	AAACACGCCA	GGCTCCTTCT
mRNS UMOD Ensembl	TCACAACTGC	TCCGCCAACA	GCAGCTGCGT	AAACACGCCA	GGCTCCTTCT
	401				450
Klon IRAUp969G0689D	CCTGCGTCTG	CCCCGAAGGC	TTCCGCCTGT	CGCCCGGTCT	CGGCTGCACA
mRNS UMOD Ensembl	CCTGCGTCTG	CCCCGAAGGC	TTCCGCCTGT	CGCCCGGTCT	CGGCTGCACA
	451				500
Klon IRAUp969G0689D	GACGTGGATG	AGTGCGCTGA	GCCTGGGCTT	AGCCACTGCC	ACGCCCTGGC
mRNS UMOD Ensembl	GACGTGGATG	AGTGCGCTGA	GCCTGGGCTT	AGCCACTGCC	ACGCCCTGGC
	501				550
Klon IRAUp969G0689D	CACATGTGTC	AATGTGGTGG	GCAGCTACTT	GTGCGTATGC	CCCGCGGGCT
mRNS UMOD Ensembl	CACATGTGTC	AATGTGGTGG	GCAGCTACTT	GTGCGTATGC	CCCGCGGGCT
	551				600
Klon IRAUp969G0689D	ACCGGGGGGA	TGGATGGCAC	TGTGAGTGCT	CCCCGGGCTC	CTGCGGGCCG
mRNS UMOD Ensembl	ACCGGGGGGA	TGGATGGCAC	TGTGAGTGCT	CCCCGGGCTC	CTGCGGGCCG
	601				650
Klon IRAUp969G0689D	GGGTTGGACT	GCGTGCCCGA	GGGCGACGCG	CTCGTGTGCG	CGGATCCGTC
mRNS UMOD Ensembl	GGGTTGGACT	GCGTGCCCGA	GGGCGACGCG	CTCGTGTGCG	CGGATCCGTC

	651				700
Klon IRAUp969G0689D	TCAGGCGCAC	CGCACCTGG	ACGAGTACTG	GCGCAGCACC	GAGTACGGGG
mRNS UMOD Ensembl	CCAGGCGCAC	CGCACCTGG	ACGAGTACTG	GCGCAGCACC	GAGTACGGGG
	701				750
Klon IRAUp969G0689D	AGGGCTACGC	CTGCGACACG	GACCTGCGCG	GCTGGTACCG	CCCC.....
mRNS UMOD Ensembl	AGGGCTACGC	CTGCGACACG	GACCTGCGCG	GCTGGTACCG	CTTCGTGGGC
	751				800
Klon IRAUp969G0689D
mRNS UMOD Ensembl	CAGGGCGGTG	CGCGCATGGC	CGAGACCTGC	GTGCCAGTCC	TGCGCTGCAA
	801				850
Klon IRAUp969G0689DCATCCGTCC	AGCGACGAGG
mRNS UMOD Ensembl	CACGGCCGCC	CCCATGTGGC	TCAATGGCAC	GCATCCGTCC	AGCGACGAGG
	851				900
Klon IRAUp969G0689D	GCATCGTGAG	CCGCAAGGCC	TGCGCGCACT	GGAGCGGCCA	CTGCTGCCTG
mRNS UMOD Ensembl	GCATCGTGAG	CCGCAAGGCC	TGCGCGCACT	GGAGCGGCCA	CTGCTGCCTG
	901				950
Klon IRAUp969G0689D	TGGGATGCGT	CCGTCCAGGT	GAAGGCCTGT	GCCGGCGGCT	ACTACGTCTA
mRNS UMOD Ensembl	TGGGATGCGT	CCGTCCAGGT	GAAGGCCTGT	GCCGGCGGCT	ACTACGTCTA
	951				1000
Klon IRAUp969G0689D	CAACCTGACA	GCGCCCCCG	AGTGTCACCT	GGCGTACTGC	ACAGACCCCA
mRNS UMOD Ensembl	CAACCTGACA	GCGCCCCCG	AGTGTCACCT	GGCGTACTGC	ACAGACCCCA
	1001				1050
Klon IRAUp969G0689D	GCTCCGTGGA	GGGGACGTGT	GAGGAGTGCA	GTATAGACGA	GGACTGCAAA
mRNS UMOD Ensembl	GCTCCGTGGA	GGGGACGTGT	GAGGAGTGCA	GTATAGACGA	GGACTGCAAA
	1051				1100
Klon IRAUp969G0689D	TCGAATAATG	GCAGATGGCA	CTGCCAGTGC	AAACAGGACT	TCAACATCAC
mRNS UMOD Ensembl	TCGAATAATG	GCAGATGGCA	CTGCCAGTGC	AAACAGGACT	TCAACATCAC
	1101				1150
Klon IRAUp969G0689D	TGATATCTCC	CTCCTGGAGC	ACAGGCTGGA	ATGTGGGGCC	AATGACATGA
mRNS UMOD Ensembl	TGATATCTCC	CTCCTGGAGC	ACAGGCTGGA	ATGTGGGGCC	AATGACATGA
	1151				1200
Klon IRAUp969G0689D	AGGTGTGCT	GGGCAAGTGC	CAGCTGAAGA	GTCTGGGCTT	CGACAAGGTC
mRNS UMOD Ensembl	AGGTGTGCT	GGGCAAGTGC	CAGCTGAAGA	GTCTGGGCTT	CGACAAGGTC
	1201				1250
Klon IRAUp969G0689D	TTCATGTACC	TGAGTGACAG	CCGGTGCTCG	GGCTTCAATG	ACAGAGACAA
mRNS UMOD Ensembl	TTCATGTACC	TGAGTGACAG	CCGGTGCTCG	GGCTTCAATG	ACAGAGACAA
	1251				1300
Klon IRAUp969G0689D	CCGGGACTGG	GTGTCTGTAG	TGACCCCAGC	CCGGGATGGC	CCCTGTGGGA
mRNS UMOD Ensembl	CCGGGACTGG	GTGTCTGTAG	TGACCCCAGC	CCGGGATGGC	CCCTGTGGGA
	1301				1350
Klon IRAUp969G0689D	CAGTGTTGAC	GAGGAATGAA	ACCCATGCCA	CTTACAGCAA	CACCCTCTAC
mRNS UMOD Ensembl	CAGTGTTGAC	GAGGAATGAA	ACCCATGCCA	CTTACAGCAA	CACCCTCTAC
	1351				1400
Klon IRAUp969G0689D	CTGGCAGATG	AGATCATCAT	CCGTGACCTC	AACATCAAAA	TCAACTTTGC
mRNS UMOD Ensembl	CTGGCAGATG	AGATCATCAT	CCGTGACCTC	AACATCAAAA	TCAACTTTGC

Klon IRAUp969G0689D mRNS UMOD Ensembl	1401	ATGCTCCTAC	CCCCTGGACA	TGAAAGTCAG	CCTGAAGACC	1450	GCCCTACAGC
		ATGCTCCTAC	CCCCTGGACA	TGAAAGTCAG	CCTGAAGACC		GCCCTACAGC
Klon IRAUp969G0689D mRNS UMOD Ensembl	1451	CAATGGTCAG	TGCTCTAAAC	ATCAGAGTGG	GCGGGACCGG	1500	CATGTTCCACC
		CAATGGTCAG	TGCTCTAAAC	ATCAGAGTGG	GCGGGACCGG		CATGTTCCACC
Klon IRAUp969G0689D mRNS UMOD Ensembl	1501	GTGCGGATGG	CGCTCTTCCA	GACCCCTTCC	TACACGCAGC	1550	CCTACCAAGG
		GTGCGGATGG	CGCTCTTCCA	GACCCCTTCC	TACACGCAGC		CCTACCAAGG
Klon IRAUp969G0689D mRNS UMOD Ensembl	1551	CTCCTCCGTG	ACACTGTCCA	CTGAGGCTTT	TCTCTACGTG	1600	GGCACCATGT
		CTCCTCCGTG	ACACTGTCCA	CTGAGGCTTT	TCTCTACGTG		GGCACCATGT
Klon IRAUp969G0689D mRNS UMOD Ensembl	1601	TGGATGGGGG	CGACCTGTCC	CGATTTGCAC	TGCTCATGAC	1650	CAACTGCTAT
		TGGATGGGGG	CGACCTGTCC	CGATTTGCAC	TGCTCATGAC		CAACTGCTAT
Klon IRAUp969G0689D mRNS UMOD Ensembl	1651	GCCACACCCA	GTAGCAATGC	CACGGACCCC	CTGAAGTACT	1700	TCATCATCCA
		GCCACACCCA	GTAGCAATGC	CACGGACCCC	CTGAAGTACT		TCATCATCCA
Klon IRAUp969G0689D mRNS UMOD Ensembl	1701	GGACAGATGC	CCACACACTA	GAGACTCAAC	TATCCAAGTG	1750	GTGGAGAATG
		GGACAGATGC	CCACACACTA	GAGACTCAAC	TATCCAAGTG		GTGGAGAATG
Klon IRAUp969G0689D mRNS UMOD Ensembl	1751	GGGAGTCCTC	CCAGGGCCGA	TTTTCCGTCC	AGATGTTCCG	1800	GTTTGCTGGA
		GGGAGTCCTC	CCAGGGCCGA	TTTTCCGTCC	AGATGTTCCG		GTTTGCTGGA
Klon IRAUp969G0689D mRNS UMOD Ensembl	1801	AACTATGACC	TAGTCTACCT	GCACTGTGAA	GTCTATCTCT	1850	GTGACACCAT
		AACTATGACC	TAGTCTACCT	GCACTGTGAA	GTCTATCTCT		GTGACACCAT
Klon IRAUp969G0689D mRNS UMOD Ensembl	1851	GAATGAAAAG	TGCAAGCCTA	CCTGCTCTGG	GACCAGATTC	1900	CGAAGTGGA
		GAATGAAAAG	TGCAAGCCTA	CCTGCTCTGG	GACCAGATTC		CGAAGTGGA
Klon IRAUp969G0689D mRNS UMOD Ensembl	1901	GTGTCATAGA	TCAATCCCGT	GTCCTGAACT	TGGGTCCCAT	1950	CACACGGAAA
		GTGTCATAGA	TCAATCCCGT	GTCCTGAACT	TGGGTCCCAT		CACACGGAAA
Klon IRAUp969G0689D mRNS UMOD Ensembl	1951	GGTGTCCAGG	CCACAGTCTC	AAGGGCTTTT	AGCAGCTTGG	2000	GGCTCCTGAA
		GGTGTCCAGG	CCACAGTCTC	AAGGGCTTTT	AGCAGCTTGG		GGCTCCTGAA
Klon IRAUp969G0689D mRNS UMOD Ensembl	2001	AGTCTGGCTG	CCTCTGCTTC	TCTCGGCCAC	CTTGACCCTG	2050	ACTTTTCAGT
		AGTCTGGCTG	CCTCTGCTTC	TCTCGGCCAC	CTTGACCCTG		ACTTTTCAGT
Klon IRAUp969G0689D mRNS UMOD Ensembl	2051	CACTGACAGC	GGAAAGCCCT	GTGCTCCATG	GCTGCCATCT	2100	CACCTCCTGC
		CACTGACAGC	GGAAAGCCCT	GTGCTCCATG	GCTGCCATCT		CACCTCCTGC
Klon IRAUp969G0689D mRNS UMOD Ensembl	2101	TGGGCAGGGG	GCATGATGCG	GGCCAGTGCT	CCAGCCACAG	2150	AAAAGAAAGT
		TGGGCAGGGG	GCATGATGCG	GGCCAGTGCT	CCAGCCACAG		AAAAGAAAGT

	2151					2200
Klon IRAUp969G0689D	TCATGCTTTG	TTCAGCCTGC	CTTCTTTTCT	CCCTTTTAAT	CCTGGCTGTC	
mRNS UMOD Ensembl	TCATGCTTTG	TTCAGCCTGC	CTTCTTTTCT	CCCTTTTAAT	CCTGGCTGTC	
	2201					2250
Klon IRAUp969G0689D	GAGAAACAGC	CTGTGTCTTT	AAATGCTGCT	TTTTCTCAAA	ATGGGACTTG	
mRNS UMOD Ensembl	GAGAAACAGC	CTGTGTCTTT	AAATGCTGCT	TTTTCTCAAA	ATGGGACTTG	
	2251					2300
Klon IRAUp969G0689D	TGACGGTGTA	CCTGAGGCC	CCATCTCCTT	AAAGAGTGTG	GCAAAATAAA	
mRNS UMOD Ensembl	TGACGGTGTA	CCTGAGGCC	CCATCTCCTT	AAAGAGTGTG	GCAAAATAAT	
	2301					2327
Klon IRAUp969G0689D	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAA			
mRNS UMOD Ensembl	GATTTTAA	TCTCA~~~~~	~~~~~			

 Translationsstartpunkt  Stopcodon

Veröffentlichungen

de Jel A., Grünewald C., Neumann C., Bergmann C., Zerres K., Büttner R. und Kirfel J., Polyductin/Fibrocytin interacts with UMOD- cross talk between proteins involved in hereditary kidney diseases ?, *Kidney International*, zur Publikation eingereicht.